

國立臺灣大學生命科學院植物科學研究所

碩士論文

Institute of Plant Biology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis

植物青枯病菌致病基因*RSc0411*及*murI*之功能性研究

Functional studies of *Ralstonia solanacearum* novel
pathogenicity determinants *RSc0411* and *murI*



Wen-Chien Yang

指導教授：鄭秋萍 博士

Advisor: Dr. Chiu-Ping Cheng

中華民國九十八年七月

July, 2009

國立臺灣大學碩士學位論文
口試委員會審定書

植物青枯病菌致病基因 *RSc0411* 及 *murI* 之功能性研究
Functional studies of *Ralstonia solanacearum*
novel pathogenicity determinants
RSc0411 and *murI*

本論文係楊文潔君 (R96B42017) 在國立臺灣大學植物科學研究所完成之碩士學位論文，於民國九十八年七月十五日承下列考試委員審查通過及口試及格，特此證明

口試委員：

中興大學分子生物學研究所

翁淑芬 博士

亞洲蔬菜研究發展中心

王肇芬 博士

中央研究院植物暨微生物學研究所

賴爾珉 博士

台灣大學植物科學研究所

鄭秋萍 博士 (指導教授)

翁淑芬

王肇芬

賴爾珉

鄭秋萍

謝誌

勤耕兩年，以汗水淚水澆灌實驗種子，在大家愛的滋潤下慢慢茁長，結出第一顆青澀的論文果實，苦中帶甜，甜中含酸，箇中滋味，難以言喻。

本論文得以順利完成，首先誠摯感謝我的指導教授鄭秋萍老師，老師這兩年不厭其煩的諄諄教誨使我得以成長，頻繁的討論與適時的建議讓我越來越清晰的看見研究輪廓，了解探索未知需要熱忱活力與堅忍意志力。接著要感謝我的口試委員翁淑芬老師、王肇芬老師及賴爾珉老師，謝謝老師們百忙中悉心審閱論文初稿，提供專業的意見與指正，使本論文更加嚴謹。

謝謝鄭家的家人們，感謝玉梅學姐對我的關心，包容我的任性與慢半拍的後知，與你比鄰而座真的很幸運，隨手就可以翻閱 May 牌百科字典，比 Google 還厲害喔。感謝安琪學長在我進度報告時常常給我適時的建議，你的模仿秀在我疲累研究生活中注入一股活力。感謝小朱學姐對我實驗的教導及照顧，你是我永遠的老大，我永遠敬愛你。感謝大好人培城學長及 RT 高手永義學長一年多的照顧，你們當兵後我們大家都很想念你們。感謝怡君學姊的教導，你對實驗的熱忱與細心是我最佳的典範。感謝淑蓮學姊像個大姐姐一樣照顧著實驗室的家人，你真誠的鼓勵像陽光般溫暖。感謝巧燕學姐在我寫論文時不時替我打氣加油，窩心的鼓勵永銘吾心。感謝與我一起奮鬥兩年的同窗們，感謝千千這兩年的相伴，有你在身邊，共同分享生活點滴，傾訴實驗辛酸，這些日子雖苦，但因你而甘，有你真好，希望我們可以永遠互相鼓勵砥礪，不斷往前躍進。感謝同一實驗桌的趙丁丁，你的趙式幽默雖然我常常笑不出來，但不影響我們以垃圾話構築的友誼。感謝阿宅團長冠中，讓我見識到最流行的阿宅文化，我相信阿宅也有春天的，加油。感謝實驗室的學弟妹們，季穎、宗霖、芸璐、雅婷，有你們的加入，讓我們實驗室更有活力。

感謝隱身在台大各系所的大學同學們阿攻、酷兒、老張、老廖，雖然這兩年我們聚少離多，但同是台大研究生的心情，讓我們相知相惜相憐，與你們聚會時我都欣喜若狂，可以盡情一吐苦水抑或分享成功喜悅，有你們真好。感謝植科所九樓所有的老師、學長姐與同學們，你們的協助與鼓勵，讓我獲益良多。感謝台大紫竹林的土地公土地婆，每當我實驗不順遂時，總感覺您就在我身邊護佑著我，讓我像吃顆定心丸似的有信心可以征服一切。

感謝我最親愛的家人，感謝奶奶的栽培與鼓勵，感謝在下雨時開車接送我的姑姑，感謝爸爸每天不辭辛苦來捷運站接我，替我準備營養果汁，給我充足的活力與滿滿的信心。感謝媽媽每天辛苦的替我準備愛心便當，在寒冬夜晚為我遞熱湯，在炎夏深夜幫我備水果。我親愛家人的笑容與呵護備至的關懷，讓我無懼實驗困難，以微笑全力迎接任何挑戰。

也許大家覺得我是實驗順遂的幸運兒。但我覺得我最幸運的是擁有支持我深愛我的家人、關懷照顧學生的指導老師、一群關心我的學長姐及與我並肩而戰的朋友們，我愛你們，在此以誠摯的心將此本論文獻給你們。

文潔 2009 七月 緘

中文摘要

由 *Ralstonia solanacearum* 所引起的青枯病 (又稱為細菌性萎凋病) 係一全球重要之土壤傳播性維管束病害, 但目前我們對於這個極為複雜且破壞力極強的病菌的了解仍是十分有限。先前的研究已經篩選到致病力缺失之青枯病菌突變株群, 在其中兩個突變株中, 跳躍子插入的基因分別為 *RSc0411* 與 *RSc1956*, 本論文之研究目標為深入探討其之確切功能。首先, *LptC* 係一廣泛存在細菌但功能未知的 DUF1239 蛋白家族之一員, 目前研究推測在大腸桿菌中此蛋白可能參與脂多醣 (lipopolysaccharides 或 LPS) 之生合成與運送。*RSc0411* 之預期蛋白產物係 DUF1239 成員。由目前研究之結果發現, 青枯病菌 *RSc0411* 突變株之粗型脂多醣(R-LPS)合成有缺失, 其致病能力嚴重喪失, 且游動力、生物膜(biofilm)形成能力及對番茄根部的附著力皆有明顯下降, 且無法誘導菸草產生過敏反應(hypersensitive response), 而進一步的結果也驗證 *RSc0411* 突變後造成青枯病菌第三型分泌系統無法被正常誘導。此外, 雖然在許多革蘭氏陰性細菌中 *lptC* 相關的基因成員組合具保守性, 啟動子分析結果顯示在青枯病菌中之實際操縱子組成(operon organization)與大腸桿菌並不同, 且將其他革蘭氏陰性菌的 DUF1239 蛋白基因互補到 *RSc0411* 突變株後發現, 只有親緣近序列相似度高的同源基因可以功能互補 *RSc0411* 之缺失, 推測可能是因為與 *Ralstonia* 屬親緣相近之細菌的 DUF1239 蛋白質已經演化出具較類似之特別且新穎的功能, 同時參與細菌 R-LPS 之生合成和第三型分泌系統。本論文第二部份的工作係研究 *RSc1956* (*murI*) 之功能, 其預期蛋白產物係 glutamate racemase, 負責將 L-glutamate 轉化為 D-glutamate, 而 D-glutamate 是組成細菌細胞壁肽聚醣的重要成分, 可以保護細菌的細胞壁免受細胞的蛋白質酶攻擊。由目前之研究結果發現, *murI* 突變雖然不會明顯影響生物膜形成、根部附著力和分解植物細胞壁酵素之分泌, 但是會造成致病能力嚴重喪失, 且游動力明顯下降, 而互補試驗亦進一步證實此基因確實為青枯病之關鍵致病基因, 且瞭解到其基因啟動子對於有效地表現此基因之功能十分重要。藉由這些分子層面的試驗與分析, 本研究得以

確認並深入探討新穎蛋白 RSc0411 與 RSc1956 確實是青枯病菌之關鍵致病基因，且對於其相關分子機制有所領悟；希望藉由深入且全面性地了解青枯病菌的致病機制、其主導基因、各訊息傳導途徑間之交互作用與調控，未來可以研擬破壞病菌感染的管道，得以研發有效控制此嚴重病害的可能策略。

關鍵詞：青枯病菌、脂多醣、DUF1239 蛋白、LptC、第三型分泌系統、MurI



Abstract

Ralstonia solanacearum is a soil-borne bacterium infecting vascular system, causing lethal wilting symptoms on many economically important crops and resulting severe crop losses. Previously, we carried out transposon (*Tn5*) insertional mutant screens to identify genes involved in pathogenesis of *R. solanacearum*. Two mutants containing a transposon insertion in *RSc0411* or *RSc1956* (*murI*) were found to be avirulent both on tomato and *Arabidopsis*. The aims of this study are to further elucidate roles of these genes in bacterial pathogenesis and the molecular mechanisms involved. Firstly, *R. solanacearum* *RSc0411* is a homologue of *E. coli* *lptC*. *LptC*, a member of the novel protein family DUF1239, is suggested to be involved in *E. coli* lipopolysaccharides (LPS) transport into the outer membrane. Here we showed that *RSc0411* mutant was defective in cell integrity and in rough LPS production. Notably, this mutant displayed defects in various pathogenesis-related properties and the induction of the type III secretion system was attenuated. The organization of DUF1239-related gene cluster is conserved among gram-negative bacteria, while sequence homology among orthologous genes in the cluster and those involved in LPS biogenesis varied according to phylogenetic relationships. Complementation tests revealed that only DUF1239 members in bacteria phylogenetically related to *R. solanacearum* were functional to rescue the mutant's defects, further suggesting certain specificity in the *RSc0411*-involved pathogenesis mechanism and LPS biogenesis machineries may have evolved. Collectively these results imply a novel and crucial role of *RSc0411* in early pathogenesis and LPS biogenesis of *R. solanacearum*. Secondly, *R. solanacearum* *RSc1956* encodes glutamate racemase (*MurI*) protein. *MurI* catalyzes the conversion of L-glutamate to D-glutamate which is an essential component of peptidoglycans in bacterial cell walls. Here we showed that, although *RSc1956* mutant

behaved similar to the wild-type strain in biofilm formation, root attachment and production of plant cell wall degrading enzymes, it was defective in swimming motility and avirulent in tomato plants. Complementation tests further confirmed the key role of *RSc1956* in *R. solanacearum* pathogenesis and revealed the importance of its promoter in precisely expressing MurI function. Taken together, these detailed studies on RSc0411 and RSc1956 are expected to pave the way not only for elucidating mechanisms and determinants involved in *R. solanacearum* pathogenesis but also potentially establishing useful disease control means.

Keywords: *Ralstonia solanacearum* 、DUF1239 、LptC 、lipopolysaccharide 、type III secretion system 、MurI



常用名詞之縮寫與全名對照表

縮寫	全名
Amp	Ampicilin
BSA	Bovine serum albumin
bp	Base pair
CFU	Colony formation unit
DEPC	Diethylpyrocarbonate
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMSO	Dimethyl sulfoxide
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
DPI	Days post inoculation
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EPS	Exopolysaccharide
EtBr	Ethidium bromide
Gen	Gentamycin
IM	Inner membrane
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
Kan	Kanamycin
LPS	Lipopolysacchride
MOPS	3- (N-morpholino) propanesulfonic acid
OD	Optical density
OM	Outer membrane
ORF	Open reading frame
PCR	Polymerase chain reaction
RNA	Ribonucleic acid
rpm	Rotation per minutes
RT-PCR	Reverse transcription- PCR
SA	Salicylic acid
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SM1	Semi-selective medium
TEM	Transmission electron microscopy
Tet	Tetracycline
TTC	2,3,5-triphenyl- tetrazolium chloride
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethane

目次

口試委員會審定書	i
致謝	ii
中文摘要	iii
英文摘要	v
常用名詞之縮寫與全名對照表	vii
目次	viii
表目次	xiii
圖目次	xiv
附錄目次	xvi
第一章 前言	1
. 植物病原菌的致病策略	1
. 植物病原菌的第三型分泌系統	1
. 青枯病菌 (細菌萎凋病)	3
. 青枯病菌之致病機制	4
1. 胞外多醣體 (exopolysaccharides, EPS)	4
2. 游動力、趨化性及趨氧性	5
3. 分解植物細胞壁的酵素 (plant cell wall degrading enzymes, CWDEs)	5
4. 螯鐵蛋白 (siderophores)	6
5. 第三型分泌系統	6
6. 細菌脂多醣 (lipopolysaccharides 或簡稱 LPSs)	7
7. PhcA 調控青枯病菌致病網	7
. LPS 合成與運送機制及 DUF1239 相關研究	8
. murI 基因的相關研究	9
研究目標	11
第二章 實驗材料與方法	13
1. 萃取青枯病菌 genomic DNA	13
2. 製備 plasmid DNA	13

3.選殖技術與程序 (Cloning and transformation in E. coli)	14
3-1.聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)	14
3-2.DNA 純化	15
3-3.限制酶 (restriction enzyme) 的消化水解 (digestion)	15
3-4.載體與基因之接合 (ligation)	15
3-5.大腸桿菌勝任細胞的轉型作用	15
4. 構築質體	15
4-1.構築互補	15
4-2.構築 lacZ transcriptional fusions	16
5. 青枯病菌勝任細胞的製備與轉型作用	16
5-1.青枯病菌勝任細胞的製備	16
5-2.青枯病菌勝任細胞的轉型作用	16
6. 製備 allelic mutants	17
7. RNA 表現的測定	17
7-1.萃取青枯病菌的 RNA	17
7-2.甲醛電泳膠體製備	18
7-3.反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)	18
7-4.即時定量 RT-RCR	18
8. 生理特性分析	18
8-1.生長曲線	18
8-2.點盤分析	19
8-3.青枯病菌在植物體內增生能力分析	19
8-4.逆境反應分析	19
8-5.細菌碳源、氮源 (Biolog TM) 和 API-Zym 酵素的分析	19
8-6.穿透式電子顯微鏡	20
9. 青枯病菌致病力相關能力之分析	20
9-1.游動能力的測試	20
9-2.番茄根部的附著力測試	20
9-3.生物膜形成能力之分析	21

9-4.胞外酵素 (Exoenzyme activity) 的分析	21
9-5.菸草的反應測試	21
9-6.番茄病原性測試	22
10. 青枯病菌脂多醣的測定	22
10-1.青枯病菌脂多醣的萃取	22
10-2.一維電泳 (SDS-PAGE) 的製備	23
10-3.青枯病菌脂多醣銀染分析	23
11. β -galactosidase activity assay	23
 第三章 結果	 25
. <i>RSc0411</i> 基因之功能分析	25
1. 生物資訊分析 (bioinformatics)	25
2. <i>RSc0411</i> 突變株之生理與生化特性分析	25
2-1.生長曲線	25
2-2.逆境反應分析	25
2-3.API-Zym 酵素的分析	26
2-4.細胞膜形態的觀察	26
3. <i>RSc0411</i> 突變株致病力相關能力之分析	26
3-1.細菌游動能力的測試	26
3-2.番茄根部的附著力測試	26
3-3.生物膜形成能力之分析	27
3-4.胞外酵素的分析	27
3-5.菸草的反應測試	27
3-6.番茄病原性測試	27
4. 驗證 <i>RSc0411</i> 基因功能	28
4-1.構築 isogenic 突變株	28
4-2.互補株的構築與分析	28
5. 判定青枯病菌 <i>RSc0409</i> ~ <i>RSc0413</i> 之操縱子 (operon) 結構	28
6. 青枯病菌脂多醣的測定	29
7. 以比較生物資訊學探討 DUF1239 基因群及協助 LPS 運送相關蛋白群 ..	29

8. 同源基因互補株的構築與分析.....	30
9. RSc0411 參與第三型分泌系統.....	31
10. 青枯病菌其他突變株的型態與致病能力分析.....	32
II. <i>murI</i> 基因之功能分析.....	33
1. <i>murI</i> 突變株之生理與生化特性分析.....	33
1-1. 生長曲線.....	33
1-2. 逆境反應分析.....	33
1-3. API-Zym 酵素與細菌碳、氮源 (Biolog™) 的的分析.....	33
1-4. 細胞膜形態的觀察.....	33
2. <i>murI</i> 突變株致病力相關能力之分析.....	33
2-1. 青枯病菌早期致病因子之分析.....	33
2-2. 菸草的反應測試.....	34
2-3. 番茄病原性測試.....	34
3. 驗證 <i>murI</i> 基因功能.....	34
3-1. 構築 isogenic 突變株.....	34
3-2. 互補株的構築與分析.....	35
第四章 討論.....	36
I. RSc0411 基因之功能探討.....	36
1. DUF1239 蛋白是否為生長必需蛋白.....	36
2. RSc0411 參與 LPS 生合成.....	36
3. 青枯病菌脂多醣對致病力相關因子之影響.....	37
4. RSc0411 參與青枯病菌第三型分泌系統之調控.....	39
5. <i>Rastonia</i> 親緣相近之 DUF1239 家族新穎功能探討.....	40
6. 青枯病菌第三型分泌系統與其它致病因子的關係.....	42
7. 青枯病菌與菸草之交互作用.....	42
II. <i>murI</i> 基因之功能探討.....	44
1. MurI 蛋白是否為生長必需蛋白.....	44
2. 青枯病菌 MurI 在細胞型態與生理特性之功能.....	45
3. 青枯病菌 MurI 影響致病力分析.....	46

4. *murI* 為青枯病菌之關鍵致病基因 47

參考文獻 49



表目次

表一、青枯病菌 *RSc0411* 研究所使用的菌株與質體..... 59

表二、青枯病菌野生株與 *RSc0411* 及 *rfaF* 突變株的特性比較..... 62

表三、參與脂多醣生合成相關基因之序列比較..... 64

表四、青枯病菌 *murI* 研究所使用的菌株與質體..... 68

表五、青枯病菌野生株與 *murI* 突變株的特性比較總表..... 69



圖目次

I、 <i>RSc0411</i> 基因之功能分析.....	71
圖一、青枯病菌野生型菌株 Pss190 和其 <i>RSc0411</i> 突變株的生長曲線.....	71
圖二、青枯病菌各個菌株在不同固體培養基下的生長情形.....	72
圖三、野生型菌株和 <i>RSc0411</i> 突變株在菸草 <i>N. benthamiana</i> 內的增生.....	73
圖四、穿透式電子顯微鏡觀察青枯病菌野生型菌株和 <i>RSc0411</i> 突變株細胞膜 型態.....	74
圖五、青枯病菌野生型菌株和 <i>RSc0411</i> 突變株游動力 (swimming) 測試.....	75
圖六、青枯病菌野生型菌株和 <i>RSc0411</i> 突變株游動力 (twitching) 測試.....	76
圖七、青枯病菌野生型菌株和其各式互補株對番茄根部著附著力分析.....	77
圖八、青枯病菌野生型菌株、 <i>RSc0411</i> 突變株和互補株生物膜形成能力之 分析.....	78
圖九、青枯病菌野生型菌株、 <i>RSc0411</i> 突變株和互補株對菸草的反應分析....	79
圖十、青枯病菌野生型菌株、 <i>RSc0411</i> 突變株及互補株番茄病原性測試.....	80
圖十一、青枯病菌 <i>RSc0409</i> ~ <i>RSc0413</i> 之操縱子 (operon) 結構.....	81
圖十二、青枯病菌 <i>RSc0411</i> 與大腸桿菌 <i>LptC</i> 胺基酸序列比對.....	82
圖十三、利用銀染分析各式青枯病菌株之脂多醣生合成.....	83
圖十四、比較各細菌中 <i>DUF1239</i> 相關基因群之操縱子結構及基因成員.....	84
圖十五、青枯病菌野生株與 <i>RSc0411</i> 突變株第三型分泌系統相關基因表現量 的測定.....	85
圖十六、 <i>RSc0411</i> 啟動子在不同菌株中的表現分析.....	86
圖十七、青枯病菌野生株、 <i>RSc0411</i> 突變株及其他膜完整性缺失突變株特性 分析.....	87
II、 <i>murI</i> 基因之功能分析.....	88
圖十八、青枯病菌野生型菌株和 <i>murI</i> 突變株生長速度比較.....	88
圖十九、青枯病菌野生菌株和 <i>murI</i> 突變株在不同固體培養基下的生長情形.....	89
圖二十、青枯病菌野生型菌株和其 <i>murI</i> 突變株碳源 (Biolog™) 利用分析....	90
圖二十一、穿透式電子顯微鏡觀察青枯病菌野生菌株和 <i>murI</i> 突變株細胞態.....	91
圖二十二、青枯病菌野生型菌株和 <i>murI</i> 突變株游動能力的測試.....	92
圖二十三、青枯病菌野生型菌株和 <i>murI</i> 突變株游動力 (twitching) 測試.....	93

圖二十四、青枯病菌野生型菌株和 *murI* 突變株番茄根部附着力與生物膜形成能力分析 94

圖二十五、青枯病菌野生菌株和 *murI* 突變株於菸草的反應 95

圖二十六、青枯病菌野生菌株和 *murI* 突變株番茄病原性測試 96

圖二十七、青枯病菌野生菌株、*murI* 突變株和其互補株游動力 (swimming) 測試 97



附錄目次

附錄一、青枯病菌 <i>RSc0411</i> 研究所使用之引子	98
附錄二、青枯病菌 <i>murI</i> 研究所使用之引子	101
附錄三、利用生物資訊軟體分析 DUF1239 蛋白家族	102
附錄四、RSc0411 膜蛋白的預測	103
附錄五、大腸桿菌 LPS 的合成與運送及 LPS 運送突變株之表現型態分析	104
附錄六、青枯病菌複雜的致病調控系統	105
附錄七、實驗室前人測試野生型菌株 Pss190 及其突變株在番茄及阿拉伯芥 病原性	106
附錄八、實驗室前人在 Pss190 背景下互補 <i>murI</i> 突變株的病原性分析	107
附錄九、本研究 Pss4 背景下 <i>murI</i> 突變株進行不同長度的互補實驗	108
附錄十、肽聚醣生合成路徑圖	109
附錄十一、生物體內 glutamate 的代謝路徑	110
附錄十二、常用培養基配方	111



第一章 前言

· 植物病原菌的致病策略

植物病原細菌生存於不同環境，不只生活於植物體內、表面，也可伺機殘存於土中、水中，一個成功的植物病原細菌必須正確的感應周遭環境的變化並準確的調控其致病網。目前已知，在各個病原菌致病網中最重要機制包括有 quorum sensing (QS)、two-componet regulatory (2-CR)和 AraC-type regulators (Soto et al., 2006; Mole et al., 2007)；QS 可以藉由感應細菌族群大小而調控其毒力基因的表現，通常 QS 的感應訊號為 *N*-acylhomoserine lactones (AHLs)，如：*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*，但有些細菌可以感應其他分子，如 *R. solanacearum* 感應 3-hydroxypalmitic acid methyl ester (3-OH PAME)(Flavier et al., 1997)。在細菌族群稀少時，QS 可以調控入侵寄主所需的毒力因子，如：游動力 (swimming and twitching motility)、生物膜 (biofilm) 的形成和分泌破壞植物細胞壁的分解酵素，使之表現增加，當族群數量較多時，QS 可以關閉早期致病毒力基因表現，活化後期致病基因表現 (Soto et al., 2006)。2-CR 是細菌感應外在環境變化而直接調控單一基因或一群毒力相關基因的表現，使之可快速適應新環境，2-CR 系統通常包含一個 sensor protein kinase 和一個 response regulator，如：*Agrobacterium tumefaciens* 的 ChvG/ChvI 系統和 *R. solanacearum* 的 VsrA/VsrD 系統 (Soto et al., 2006; Mole et al., 2007)。而 AraC-type regulators 可以調控病原菌的重要致病機制第三型分泌系統。

II. 植物病原菌的第三型分泌系統

許多革蘭氏陰性細菌都有第三型分泌系統，目前植物病原菌 *P. syringae*、*R. solanacearum*、*Xanthomonas* 屬和 *Erwinia* 屬皆有不少相關的研究，而在動物病原菌 *Salmonella enterica*、*Yersinia* spp.、*Escherichia coli* 和 *Shigella dysenteriae* 中也有深入的探討研究 (Hueck, 1998; Troisfontaines and Cornelis, 2005)。這些病原菌用第三型分泌系統攻擊它們的寄主，細菌藉由 channel 與宿主細胞膜結合之後，形成類針管構造，將毒力蛋白 (effector) 注射入宿主的細胞質內造成宿主細胞的破壞 (Tang

et al., 2006)。在動物病原菌中，此類針管構造稱之為 needle，而在植物病原菌中稱之為 Hrp pilus (hypersensitive response and pathogenicity pilus)，而 Hrp pilus 因需要通過植物細胞壁長距離運輸毒力蛋白到寄主植物中，所以較 needle 長。病原菌的第三型分泌系統可以抑制或破壞寄主的基本防禦，包括直接抑制防禦訊號的傳遞 (Shang et al., 2006; Vinatzer et al., 2006)、抑制 salicylic acid-dependent 防禦機制 (Jelenska et al., 2007)、影響乙烯生成 (Cohn and Martin, 2005) 或破壞細胞壁基本防禦 (Hauck et al., 2003)，進而入侵寄主組織獲取營養。除了病原菌外，植物或動物內共生菌也有第三型分泌系統，如豆科植物根瘤菌 *Rhizobium* NGR234 可藉由第三型分泌系統共同調控誘導根瘤的形成，促進共生作用 (Marie et al., 2001)。

病原菌若遇到非寄主植物，則無法入侵植物獲取其營養；若病原菌遇到抗性植物，會產生不相容反應 (incompatible interaction)，病原菌產生的 Avr 蛋白 type III secreted effectors (T3SEs) 會與植物的抗性蛋白 (R protein) 辨認，而誘導植物的抗病防禦機制，使細菌入侵點附近的植物細胞壁增厚產生 callose，植物釋放過氧化物引起入侵點附近細胞快速凋亡 (programmed cell death)，以阻止病菌增生與傳播，這種強烈的防禦反應稱之為過敏性反應 (hypersensitive response；HR) (Hammond-Kosack and Jones, 1996)，若病菌感染感病植株，病菌產生的 T3SEs 無法與植物的抗性蛋白辨認，不會誘導產生過敏性反應及植物的抗病反應，病菌可以順利感染植株產生病徵 (Stavrínides, 2008)。

第三型分泌系統由 *hrp* 基因所調控，大多數植物病原細菌的 *hrp* 基因存在於染色體上，只有青枯病菌的 *hrp* 基因是位於一圓狀巨質體 (megaplasmid) (He et al., 2004)。按照 *hrp* 基因調控、組成、同源性的不同，可將這群植物病原菌分做兩群，第一群包括 *P. syringae* 和 *Erwinia* 屬，第二群包括 *R. solanacearum* 和 *Xanthomonas* 屬，這兩群 *hrp* 基因皆需植物細胞或在營養貧瘠培養基中添加特殊的碳源才可誘導其表現 (Buttner and Bonas, 2006)。不同病原菌的 *hrp* 調控基因有所不同，在 *P. syringae* 中，*hrpR*、*hrpS* 和 *hrpL* 是 *hrp* 基因主要的調控者，*hrpR* 和 *hrpS* 交互作用

後和 σ^{54} 結合並活化 *hrpL* 的表現，*hrpL* 再調控下游其他 *hrp* 基因的表現，進而影響毒力蛋白的產生(Tang et al., 2006)。在 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 中，*hrpG* 和 *hrpX* 是 *hrp* 基因主要的調控者，*hrpG* 活化 *hrpX* 和 *hrpA* 的轉錄並且 *hrpX* 隨之活化其他 *hrp* 基因的轉錄(Tang et al., 2006)。

III. 青枯病 (bacterial wilt, 細菌萎凋病)

由 *R. solanacearum* 所引起的青枯病 (又稱為細菌性萎凋病) 係一全球重要之土壤傳播性維管束病害，此病原細菌可以在土壤中長期殘存，危害之作物範圍涵括五十幾屬，超過 200 種作物，在熱帶及亞熱帶發生尤其嚴重(Hayward 1991; Denny 2006)，而且此病害現已擴展到溫帶地區 (Kim et al., 2003)。在自然的感染過程中，青枯病菌自番茄的根部二次根突破點或根尖進入植物體，進行大量繁殖，並更深入植物輸送水份的木質部 (Vasse et al., 1995)。接著，菌體進行系統性的遽增，並伴隨著大量胞外多醣體的產生，導致維管束阻塞，寄主植物因而萎凋死亡，青枯病菌則在潮濕的環境條件下，可以在潰倒的植物組織內存活 (Buddenhagen and Kelman, 1964)。

青枯病菌係革蘭氏陰性好氧之桿菌，屬於 β -proteobacteria 菌群，根據各種生化、分子及代謝特性，青枯病菌可以被歸為四個 phylotypes、五個 biovars、五個 races 及許多 strains (Denny, 2006)。感染番茄的青枯病第一生理小種 (race 1) 在基因型及毒力上之差異性皆非常高且複雜 (Jaunet and Wang, 1999)，而番茄抗病品種在不同地區及針對不同菌株的抗病穩定性亦有差異(Chellemi et al., 1994; Lopes et al., 1994; Hanson et al., 1998)，這些事實均顯示青枯病菌的多元化與青枯病的複雜性。

青枯病菌的基因組共約 5.8 Mbp，包含一個圈狀之染色體及一個圈狀巨質體 (megaplasmid)。近來，分離自番茄且具廣寄主性的 strain GMI1000 (phylotype I, biovar 3, race 1) 基因組已經被定序完畢(Salanoubat et al., 2002)，此外，另有屬於不同 biovars 及 races 的 strains IPO1609、Molk2 (C. Boucher NCBI web) 及 strain UW551 (Gabriel et al., 2006) 的基因組序列初稿(genome drafts)也已經被完成。Molk2

(phylotype II, biovar 1, race 2) 係熱帶且寄主範圍僅限於香蕉屬 (*Musa* sp.) 的菌株，IPO1609 (phylotype II, biovar 2, race 3) 係熱帶且寄主範圍僅限於番茄與馬鈴薯的菌株，而 UW551 (phylotype II, biovar 2, race 3) 則是源自於天竺葵的熱帶菌株 (Garbriel et al., 2006)。

Salanoubat 等人(2002)分析 GMI1000 基因組時發現，其染色體及巨質體皆有 mosaic structure，顯示青枯病菌常由水平基因移轉取得外來基因；此外，發現基因體中跳躍因子 (mobile/transposable elements)常與異常高的 G+C content 的區域相繫著，因此可能在青枯病菌基因組的演化上扮演重要的角色，由於這些跳躍因子的存在，可促進基因序列的獲取、失去或改變，使得青枯病菌基因組及其表現型具高度複雜性，例如青枯病菌具有眾多 biovars 與極廣之寄主範圍。

IV. 青枯病菌之致病機制

由於青枯病菌具有眾多上述之獨特特性，因此已成為研究革蘭氏陰性植物病原菌群中的代表性菌種，對其病原性、毒力、環境適應性、寄主專一性、演化及生態等均有進行研究。為了成功地感染寄主植物，青枯病菌自土壤侵入植物，並深入植物維管束的過程中，必需突破各種難關，這包括了細菌成功游動到寄主的根部、在植物根的吸附並佔據、形成抵抗環境逆境的生物膜、獲得養分、大量增殖、移動於植物細胞間隙、侵入並佔據植物的木質部、避開或擊破寄主防禦機制等等(Denny, 2006)，所以，青枯病菌必需有效地產生各個感染步驟所需之不同基因產物。目前，人們對於青枯病菌的整體致病機制已有一些初步的了解 (Schell, 2000; Genin and Boucher, 2004)，目前已知的毒力因子(virulence factor)分述如下：

1. 胞外多醣體 (exopolysaccharides, EPS)

酸性的胞外多醣體 EPSI 是阻塞寄主植物維管束的主要毒力因子，其主要是由多醣體、蛋白質、核酸和脂質組成。若 EPSI 突變缺失則無法對寄主造成系統性感染；將 EPSI 突變株自根部澆灌感染番茄寄主，發現此突變株只能侵入根部並在莖基部造成低量的纏據，但無法自莖部往上移動，即使直接自莖部穿刺接種也無法

對番茄造成萎凋致死現象；利用水耕栽培的番茄測試其毒力，發現 EPSI 突變株亦無法移動到木質部(Saile et al., 1997；Araud-Razou et al., 1998)。

2. 游動力、趨化性及趨氧性

在自然環境中，青枯病菌需成功游到寄主植物根部才可順利感染寄主，在這個過程中細菌的游動力(swimming motility)、趨化性(chemotatic)和趨氧性(aerotaxis)是非常重要的。青枯病菌具有鞭毛可以在水中游動，無法產生鞭毛的突變株(*fliC*)自番茄根部接種有致病力下降的現象，但若直接用莖部穿刺感染番茄，則其致病力與野生株相似(Tans-Kersten et al., 2001)，所以推測一旦細菌進入植物後，鞭毛對於病原性不是很重要。青枯病菌可以感應並趨向最適當的生活環境(營養及氧氣充足的地方)，稱之為趨化性和趨氧性。青枯病菌可以感應並趨向寄主根部所釋出的分泌物，目前研究發現青枯病菌趨化性突變株自番茄根部感染會造成其致病力下降，趨化性是感染寄主植物中所需的早期致病因子(Denny 2006)。青枯病菌的趨氧性可以使其快速的到達植物根部，以感染植株，目前研究發現青枯病菌趨氧性接受蛋白 Aer1、Aer2 突變會降低生物膜形成能力，並延遲番茄萎凋的現象(Yao and Allen, 2007)。

不管是植物或動物病原細菌，成功吸附到寄主表面的能力是非常重要的，在革蘭氏陰性菌中這個吸附的結構稱之為線毛(*pili*)或纖毛(*fimbriae*)。許多細菌會藉由 type 4 *pili* 在固體表面移動，稱之為 twitching motility (Strom and Lory, 1993)。在青枯病菌中，type 4 *pili* 突變株不管是利用根部澆灌或直接注入到番茄體內都觀察到致病力下降(Kang et al., 2002)，並且此突變株會在液體培養時，聚集(autoaggregation)和生物膜形成的能力下降，並且無法吸附佔據(attachment)到番茄根部。

3. 分解植物細胞壁的酵素(plant cell wall degrading enzymes, CWDEs)

植物細胞壁為植物天然的屏障，可以隔絕病原菌，因此有些植物病原菌(如：青枯病菌)為了成功感染寄主，可以分泌破壞植物細胞壁的酵素，青枯病菌的細胞

壁分解酵素目前已知有六種： β -1,4-endoglucanase (Egl)、exoglucanase (ChbA)、endopolygalacturonase (PehA or PglA)、exopolygalacturonases (PehB and PehC)和 pectin methylesterase (Pme)。若將 PehA、PehB、PehC、Pme 單獨移除並不會在番茄觀察到致病力下降，但 Egl 或 ChbA 的破壞則會造成延遲發病的現象(Gonzalez and Allen., 2003; Liu et al., 2005)。這些分解酵素皆由 type II protein secretion system (T2SS)運送到外膜，T2SS 會誘導植物的防禦反應，而植物的防禦會被 T3SS 所抑制(Liu et al., 2005)。

4. 螯鐵蛋白(siderophores)

許多細菌都會產生螯鐵蛋白以獲取鐵離子，有些植物病原細菌需要 iron-acquisition system 才有致病力。在青枯病菌中的螯鐵蛋白為schizokinen，可以產生polycarboxylate螯鐵蛋白，稱之為 staphyloferrin B (Bhatt and Denny, 2004)。目前研究已知番茄木質部中有充足的鐵離子來抑制病原菌iron-acquisition system，青枯病菌 staphyloferrin B 缺失並不影響其在番茄之致病力。

5. 第三型分泌系統

在 *R. solanacearum* 中，PrhA 蛋白產物是細菌外膜蛋白分子，可感應植物訊號，進行一連串的調控，首先調控膜蛋白 PrhR，再由 PrhR 調控轉錄因子 PrhI，PrhI 調控轉錄因子 PrhJ，*prhJ* 基因與轉錄因子 Lux/JphA 家族同源，PrhJ 調控轉錄調控因子 *hrpG*，*hrpG* 是第三型分泌系統的主要調控者，*hrpG* 可藉由調控 *hrpB* (HrpB-dependent HrpG regulon)進而調控下游 20 多個 *hrp* 基因(Aldon et al., 2000 ;Cunnac et al., 2004; Valls et al., 2006)，進而影響 70 多個毒力蛋白的表現 (Cunnac et al., 2004; Angot et al., 2006)，如製造分泌管道的基因 *hrpY* 和被分泌胞外的毒力蛋白 PopA 與 PopC，而被 *hrpB* 調控的基因大多有一個序列保守的啟動子區域 *hrp* box (Cunnac et al., 2004)。HrpG 也可以藉由非 HrpB 的調控路徑 (HrpB-independent HrpG regulon)去影響其他致病因子的表現，如分解植物細胞壁的酵素(plant cell wall degradation enzymes)、植物性荷爾蒙(phytohormone)乙烯和植

物生長素(auxin) (Valls et al., 2006)。目前已知青枯病菌的 *hrp* 基因是非常重要的致病因子，若 *hrp* 基因突變，會影響其 Hrp pilus 的組成，降低病菌從根部感染植株的能力，減低其對感病植株的致病力，並且對於抗性植株失去形成過敏性反應的能力(Aldon et al., 2000 ; Vasse et al., 2000)。

6. 細菌脂多醣 (lipopolysaccharides 或簡稱 LPSs)

LPS 可以保護細菌免受胞外毒物的傷害，例如 LPS 可以保護病原菌免受寄主釋放的抗生物質所毒害，緩和寄主的防禦反應，使得病原菌得以生存並在寄主體內生長繁殖(Dow et al., 2000; Newman et al., 2007)。因此 LPS 在病原菌與寄主交互作用中會影響許多致病因子的表現，包括影響生物膜的形成和病原菌附著寄主的能力。所以，一旦 LPS biogenesis 產生變化，將影響病原細菌與寄主的交互關係，而使得病原菌的毒性和寄主感染範圍改變，或影響寄主的防禦反應(Kao and Sequeira, 1991; Thomsen et al., 2003)。雖然植物經事先處理細菌 LPS 後可以誘發植物對抗後續病原菌侵染之防禦反應是首先在青枯病菌中發現(Graham et al., 1977)，多年來，在青枯菌 LPS 的研究多著重在其種類與組成份分析(Whatley et al., 1980; Baker et al., 1984; Varbanets et al., 2003)，對其 LPS 的生合成、代謝及運送相關分子機制及其關鍵基因卻極不了解，目前有限的報導也僅指出 *ops* cluster 和 *rfaF* 基因與 LPS 合成有關(Titarenko et al., 1997)，並已知減少 LPS 生合成會降低對寄主植物的致病力(Titarenko et al., 1997)。

7. PhcA 調控青枯病菌致病網

青枯病菌的致病網是以 PhcA 為中心去調控所有青枯病菌的致病因子(見附錄六)。PhcA 可以直接或間接正調控 EPS I 的產生、DNA 的自然轉移(natural transformation)、acyl-homoserine lactone quorum sensing system (Schell, 2000; Kang et al., 2002)。並且可以負調控 PehA、PehB 的產生、staphyloferrin B 的產生、type 4 pili 的產生進而影響到 twitching motility 和生物膜的形成、swimming motility、HrpG 所調控的 T3SS。在入侵植物早期病菌數量少，不會大量產生胞外胞醣體，此時病原

菌需要游動力(swimming、twitching motility)成功吸附植物根部，再利用分泌分解植物細胞壁酵素和第三型分泌系統進入植物組織內，細菌成功進入植物組織內後便可大量增生，當細菌濃度到達一定數量後，3-OH PAME 誘導 PhcA 的活化，此時 PhcA 便會抑制之前細菌產生的毒力因子，並活化下游轉錄因子 XpsR，XpsR 和 VsrC、VsrB 複合體作用後，可以活化 *eps* transcription，產生青枯病菌最重要的致病因子 EPS I，促使細菌大量產生胞外多醣體阻塞維管束(Garg et al., 2000; Genin et al., 2005)。

、LPS 生合成與運送機制及 DUF1239 相關研究

革蘭氏陰性細菌的外膜是天然的屏障，可以有效地保護細菌免受毒物(如抗生素和化學物質)的傷害，使得細菌可以在各種環境中存活，甚至得以在不利的環境中生存。LPS 是革蘭氏陰性菌外膜的重要組成物，使其外膜結構得以完整(Bos et al., 2007)。LPS 組成主要可以分成三部分，分別是疏水性膜脂質 A (hydrophobic membrane-anchored lipid A moiety)、核心多醣(short core oligosaccharide)和多變異的 O-抗原多醣鏈(distal and most variable O-antigen polysaccharide chain)，其中若 LPS 缺少 O-antigen 稱之為粗型脂多醣(rough LPS 或簡稱 R-LPS)，若含有完整的三個組成分之 LPS 則稱之為平滑型脂多醣(smooth LPS 或簡稱 S-LPS)(Newman et al., 2007)。目前研究得知，LPS 在細胞質或內膜(inner membrane)進行合成與組成，再運送至外膜。LPS 的合成與組成機制在人類病原菌大腸桿菌 *Escherichia coli* 中已大致研究透徹，但是，LPS 被運送到外膜的相關機制則未解。一直到最近，方得以自幾項最新報告中稍加拼湊而得知 (附錄五)，LPS 的運送應該是由六個細胞質或細胞膜蛋白所共同協助完成(Sperandeo et al., 2007; Ma et al., 2008; Sperandeo et al., 2008; Tran et al., 2008; Narita and Tokuda, 2009)，目前已經將這些蛋白質重新命名為 LptA, LptB, LptC, LptD, LptE, LptF, LptG；然而，目前除了得知 LptA 蛋白可與 LPS 直接結合，而 LptB 可以和 LptF、LptG、LptC 結合形成 LptBFG 或 LptBCFG，組成 ABC transporter 外(Narita and Tokuda, 2009)，這些蛋白質的功能機制及其之間

的交互作用關係則尚未研究透徹。

DUF1239 基因家族的產物是一大約 190 個胺基酸大小的未知蛋白質，目前只有在大腸桿菌 *E. coli* 中的 LptC (之前命名 YrbK) 有所研究，由近年的研究可知 *E. coli* LptC 蛋白為膜蛋白並參與 LPS 的生合成與運送(Sperandeo et al., 2006 and 2008)。本研究欲了解在青枯病菌中的同源基因 *RSc0411* 是否也是參與 LPS 的生合成與運送，以及在致病力上扮演的角色。

VI、*murI* 基因的相關研究

MurI 蛋白為 glutamate racemase，可以將 L-glutamate 催化轉變成 D-glutamate，而 D-glutamate 是組成細菌細胞壁肽聚糖的重要成分，可以保護細菌的細胞壁免受細胞的蛋白質酶攻擊，尤其革蘭氏陽性菌細胞壁有一層較厚的肽聚糖層，因此需要更多的 D-glutamate。但若細菌形成過量的 D-glutamate 則會造成自身毒害，所以維持細菌中 glutamate 的代謝與平衡是非常重要的(Ho et al., 1995)。MurI 蛋白質的結構在細菌中可以 dimer 形式存在(如: *Helicobacter pylori*)，或是以 monomer 形式存在(如: *E. coli*)。目前 glutamate racemase 酵素相關的研究大多專注於測定酵素的活性與其蛋白質結構分析，及其 DNA gyrase inhibitor 的活性研究。目前已知 *murI* 基因被跳躍子插壞後，會影響青枯病菌對番茄和阿拉伯芥的致病力(Lin et al., 2008)，但是 *murI* 基因在致病力所扮演的角色仍然未知，這也是本篇論文欲探討的重要主題。

許多的革蘭氏陽性菌(尤其是 *Bacillus* 屬)和一種古生菌 *Natrialba* 及一種真核微生物 *Cnidaria* 可以形成 Poly- γ -glutamate (PGA)，由 D-glutamate 和 L-glutamate 組成的 PGA 可以幫助細菌在高鹽環境中生存，也影響細菌毒力因子(Candela and Fouet, 2006)。若 glutamate 量減少，則細菌的 PGA 較少，會造成其生物膜的形成下降，但不會影響其生長能力及游動力(swimming motility) (Chagneau and Saier 2004)。D-glutamate 和 L-glutamate 是細菌生存的必需胺基酸，它們參與細菌正常生理代謝、細胞分裂和細胞壁的組成。D-glutamate 的生合成可由兩種路徑產生，

其一是由 D-amino acid transaminase 催化 D-alanine 和 α -ketoglutarate 轉氨基後產生 D-glutamate，其二是由 glutamate racemase 直接催化 L-glutamate 形成 D-glutamate (Pucci et al., 1995; Fotheringham et al., 1998)。由目前的研究顯示有些細菌只找到一種可以形成 D-glutamate 的酵素，如在 *E. coli*、*Lactobacillus* 和 *Pediococcus* 屬中只有 glutamate racemase 酵素，但有些細菌如 *Staphylococcus* spp. 和 *Bacillus sphaericus* 同時有此兩種酵素在催化形成 D-glutamate (Pucci et al., 1995; Fotheringham et al., 1998)。在 *E. coli* 中，glutamate racemase 的活性是由肽聚糖前趨物 UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine (UDP-MurNAc-L-Ala) 所調控，MurI 需要 UDP-MurNAc-L-Ala 活化才可以將 L-glutamate 催化成 D-glutamate (Doublet et al., 1994)，UDP-MurNAc-L-Ala 可以辨認 *E. coli* 中 N 端的 21 個胺基酸(其他革蘭氏陽性菌中無此 21 個胺基酸)並活化其酵素(Ho et al., 1995)。由研究顯示細菌的 MurI 若為 dimer 結構，則不須 UDP-MurNAc-L-Ala 活化即可有活性(Lundqvist et al., 2007)。細菌細胞壁肽聚糖的生合成需經過許多步驟。在大腸桿菌中 D-glutamate 是肽聚糖結構中一個特別的成分，其添加到 UDP-MurNAc-L-Ala 中後，經由酵素 MurD 催化形成 UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu，再經由酵素 MurE 和 MurF 催化形成 UDP-MurNAc-pentapeptide，最後形成肽聚糖(附錄十) (Doublet et al., 1994)。在大腸桿菌中若 *murI* 條件突變，可發現其細胞分裂受到影響，而有細胞成絲狀延長的現象。若過量表現 MurI 則會造成核酸分離異常和細胞的增生被抑制(Baliko and Venetianer, 1993)。

目前研究顯示 glutamate racemase 不只參與 glutamate 的代謝，也同時為 DNA gyrase inhibitor，參與細胞分裂時 DNA processing。DNA gyrase (DNA topoisomerase II) 為 DNA processing 中最重要酵素之一，利用消耗 ATP 催化 negative supercoiling DNA 和催化 DNAs decatenation。目前已知的 DNA processing 蛋白(如: GyrI)幾乎皆有序列保守的 DNA-binding motifs，但 MurI 卻沒有 DNA-binding motifs (Ashiuchi et al., 2002)。原核生物的 DNA gyrase 可以被許多的抗生素辨認結合，這些抗生素抑

制子主要可以分為三群，第一群抑制子(如:coumarins 和 cyclothialidines)主要干擾 ATP 的水解而抑制 supercoiling 的活性，第二群抑制子(如:合成的 quinolones)可以干擾酵素和 DNA 的共價中間產物形成，最近發現第三群抑制子(如: *E. coli* 的 GyrI、*Mycobacterium sp.* 的 MfpA 及 *M. tuberculosis* 的 MurI)是利用干擾 DNA gyrase 和 DNA 結合而成功抑制 DNA gyrase (Ashiuchi et al., 2002; Sengupta et al., 2006)，其中 *M. tuberculosis* 的 MurI 可以結合到 DNA gyrase (有兩個 GyrA 和兩個 GyrB) 的 GyrA 構造中，使其無法再和 DNA 結合，而成功抑制其活性(Sengupta et al., 2006)，維持細菌體內的平衡。在大腸桿菌中的 glutamate racemase 需要肽聚醣前趨物 UDP-MurNAc-L-Ala 調控才有 DNA gyrase 抑制子的活性(Ashiuchi et al., 2002)。

Glutamate racemase 與其他的胺基酸 racemase 不同，此酵素不需任何的輔酶(如: pyridoxal-phosphate; PLP)，並且與其他的胺基酸 racemase 沒有序列相似的區段，比起其他需要輔酶 PLP 的胺基酸 racemase 此酵素的催化能力較低(Yoshimura et al., 1993)。比較不同生物中 glutamate racemase 的序列同源基因，發現除了在微生物外，在其他不需要合成肽聚醣的生物如:植物、人類也都有此基因，但此基因產物失去 glutamate racemase 的功能(Ashiuchi et al., 2002)。但在最近的研究報導中指出，人類癌症中有 glutamate racemase 同源基因大量表現，造成細胞分裂時有不正常的 DNA 複製產生(Ashiuchi et al., 2002)，相信未來有許多研究將找尋 glutamate racemase 的相似物，以調控 DNA topoisomerases，以期可以做為癌症藥物。

VII、研究目標

雖然目前關於青枯病菌之致病機制已有一些初步的資訊，但我們對於這個極為複雜且破壞力極強的病菌的了解仍是十分有限。由於青枯病菌之寄主範圍極廣，如果能夠更深入且全面性地了解此破壞力極強之病菌的致病機制、其主導基因、各訊息傳導途徑間之交互作用與調控，我們便可依據所獲資訊，積極研擬破壞病菌感染的管道，得以研發有效控制此嚴重病害的可能策略。本實驗室先前利用跳躍子(Tn5)策略篩選致病力降低的青枯病菌突變株(Lin et al., 2008)，其中兩株

突變株在番茄和阿拉伯芥的致病力都大大降低，而在其基因體中因 Tn5 插入而被影響的基因，便可能是參與青枯病菌致病力之關鍵基因。經序列比對分析發現，被 Tn5 插入者為未知功能之基因 *RSc0411*（其基因產物被分類於 DUF1239 基因家族中）與 *RSc1956 (murI)*，本研究目的為探討這兩個青枯病菌新穎致病關鍵基因在致病力及其他功能上扮演之具體角色及其參與的致病途徑。本研究先由目前已知的青枯病菌所需的致病能力（如：游動能力，生物膜的形成能力，EPS 的產生，分泌破壞植物細胞壁的酵素系統 type II secretion system，Hrp 製造的第三型分泌系統等）先作分析，再依每個基因可能參與的致病機制更深一步去研究其扮演的角色及功能。



第二章 實驗材料與方法

本論文所使用之菌株及質體請見表一、四，實驗所設計之引子序列請見附錄一、二，實驗材料部分(培養基、實驗試劑及溶液、藥品之成分配方)見附錄。本研究所使用的青枯病菌皆為從-80 冰箱劃菌到 TTC 培養基上(如果為本實驗所構築之菌株，則需添加抗生素，詳見表一、四)，在 28 的培養箱培養兩天之菌株。本研究所使用的植物為青枯病感病品系番茄 (*Solanum esculentum*) L390，菸草 *Nicotiana tabacum* Wisconsin 38 (W38) 和 *Nicotiana benthamiana*。

在第一部分 RSc0411 研究中所用的野生型菌株為存在於台灣本土番茄中所分離出的 Pss190 菌種，RSc0411 突變株為其利用 EZ::TN™ < KAN-2 > Tnp Transposome™ kit (Epicentre)所製作產生的。而第二部分 murI 研究中所用的野生型菌株為存在於台灣本土番茄中所分離出的 Pss4 菌種。murI 突變株為其利用 Transposome™ kit (Epicentre)在 Pss190 背景下所製作產生，之後再利用 DNA 自然轉型法所構築的 Pss4 isogenic 突變株。

1. 萃取青枯病菌 genomic DNA

取單一菌落至 523 液態培養基，於 28 震盪培養 12-16 小時，隔天將菌液以 13000 rpm 離心 1 分鐘，去除上清液，加入 200 μ L 的 lysis buffer，混合均勻，再加入 66 μ L NaCl，混合均勻，以 13000 rpm 離心 10 分鐘，將上清液移到新的微量離心管，加入一倍體積的 chloroform，輕搖混和均勻後，以 13000 rpm 離心 10 分鐘，取出水層的溶液至另一個微量離心管，並加入 2.5 倍體積 100% 酒精使之沉澱，離心 2 分鐘，去除上清液，再以 500 μ L 75% 的酒精洗一次後，自然乾燥後，加入 20 μ L 無菌去離子水溶解離心物，再加入 2 μ L 的 RNase A (20 μ g/mL)，置於 37 15 分鐘後，將萃取的青枯病菌 genomic DNA 存放於-20 備用。

2. 製備 plasmid DNA

一微量離心管取 1.5 mL 菌液，以 13000 rpm 離心 5 分鐘後，去上清液，加 100 μ L solution I，混合均勻，再加入 200 μ L solution II (要現配)，輕輕混合均勻，再加

入 150 μL solution，輕輕混合均勻後，以 13000 rpm 離心 10 分鐘後，取上清液至新的微量離心管，加入 4 等體積的 phenol/chloroform/isoamylalcohol (25:24:1)，PCI 分兩層，上為水層，下為有機層，取下層的 PCI 混合均勻，以 13000 rpm 離心 10 分鐘後，取上清液至新的微量離心管，加等體積的 isopropanol 和 1/10 體積的 3M NaOAc (PH6.5)，混合均勻後，靜置於 -20 30 分鐘後，以 13000 rpm 離心 5 分鐘去上清液，以 500 μL 75% 的酒精清洗一次後，自然乾燥後，加入 20 μL 無菌去離子水溶解離心物，再加入 2 μL 的 RNase A (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，置於 37 15 分鐘後，將萃取的 plasmid DNA 存放於 -20 備用。

3. 選殖技術與程序 (Cloning and transformation in *E. coli*)

3-1 聚合酶連鎖反應 (polymerase chain reaction, PCR)

PCR 試劑是利用 Taq polymerase 配合 10X Taq polymerase buffer 進行實驗。依下表分別加入反應物，先以 94 denature 5 分鐘後，再以 94 denature 30 秒；55 annealing 30 秒 (此步驟依照每對 primer 之 melting temperature 不同而加以增減)，72 elongation (1 kb 大小的目標基因約 1 分鐘，此步驟時間依照 PCR product 的大小有所不同)，通常進行 30 次循環。

進行聚合酶連鎖反應所需準備的藥品如下：

Stock	Volume	Final conc.
2.5 mM dNTP	2 μL	0.25 mM
10X PCR buffer	2 μL	1X
DMSO	2 μL	10%
10 mM primer (Fwd)	1 μL	1 mM
10 mM primer (Rev)	1 μL	1 mM
Template	x μL	
Taq polymerase (2 U/ μL)	0.2 μL	
Distilled H ₂ O	(11.7-x) μL	

Total

20 μ L

3-2 DNA 純化

將 PCR product 利用 Gel/PCR DNA fragments extraction kits (gene maker) 做純化。在 PCR product 中加入等體積之 binding buffer 和 10 μ L Silica Matrix，混合均勻後，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，將上清液去之 (只留下約 20 μ L 之上清液)，將下層的 Silica Matrix 放入 spin column 中，再以 13000 rpm 離心 1 分鐘，加入 wash buffer (含 ethanol)，以 13000 rpm 離心 5 分鐘，徹底清除 column 中的 wash buffer，加入無菌的無菌去離子水回溶 column 上的 DNA，再以 13000 rpm 離心 3 分鐘後，即可得到純化之 DNA 產物。

3-3 限制酶 (restriction enzyme) 的消化水解 (digestion)

各取約 5 μ g 載體 (vector) 與純化過後的目標基因 PCR 產物，加入 0.5 μ L 的限制酵素，10X NEBuffer 2 μ L，補無菌去離子水至最終體積 20 μ L，在 37 $^{\circ}$ C 下反應 2 小時。

3-4 載體與基因之接合 (ligation)

Insertion DNA (目標基因) 與載體以 3:1 進行混合，加入 10x ligation buffer 1 μ L 與 T4 DNA ligase 0.5 μ L，補無菌去離子水至最終體積為 10 μ L，置於 16 $^{\circ}$ C 水浴槽 16 小時。

3-5 大腸桿菌勝任細胞的轉型作用

取 5 μ L 接合作用後之質體 DNA 與 50 μ L 大腸桿菌勝任細胞混合，置於冰上 30 分鐘，放入 42 $^{\circ}$ C 水浴槽 45 秒，再置於冰上 3 分鐘後，加入 900 μ L SOC medium 混合吸出菌液，注入微量離心管中，於 37 $^{\circ}$ C 下震盪培養 1 小時。以低速離心 1 分鐘，吸去上清液，混合剩餘的液體與細胞沉澱。將混合好的菌液塗佈於具篩選力的 LB 固體培養基，於 37 $^{\circ}$ C 下隔夜培養 16 個小時。

4. 構築質體

4-1 構築互補

利用 low copy 的載體 pUFR047 (抗 Amp、Gen) 來為本實驗中跳躍子插壞的突變株構築互補株，*murI* 突變株的互補構築是在 Pss4 background，*RSc0411* 突變株的互補構築是在 Pss190 background，此外，*RSc0411* 突變株也進行其他細菌的同源基因 (ortholog) 互補，包括 *Cupriavidus taiwanensis* (*Ct*)、*Ralstonia metallidurans* (*Rme*)、*Ralstonia eutropha H16* (*Reu*)、*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (*Xcv*)、*Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Ecc*)、*Escherichia coli* (*E coli*)，所有進行互補實驗的引子都列在附錄一、二。

4-2 構築 lacZ transcriptional fusions

利用 medium copy 的載體 pCZ962 (含有一個 promoterless lacZ reporter gene，抗 Tet)，將目標基因 start codon 往前推 500 bp，來構築 lacZ transcriptional fusions 以進行 promoter activity 實驗分析，本實驗都是利用青枯病菌 Pss190 的 genomic DNA 構築。此實驗所使用的引子都列在附錄一、二。

5. 青枯病菌勝任細胞的製備與轉型作用

5-1 青枯病菌勝任細胞的製備

挑單一菌落培養於 523 液體培養基，28 °C 下 200 rpm 震盪培養 16 小時。取 1 mL $OD_{600} = 1$ 的菌液放入 100 mL 523 液體培養基中，於 28 °C 200 rpm 震盪培養至菌液到達約 $OD_{600} = 0.5$ 的濃度，即可開始製備勝任細胞。將菌液倒入離心管中，以 6500 rpm 4 °C 離心 10 分鐘，吸去上清液，以 20 mL 冰的無菌去離子水沖散細胞沉澱，再以 6500 rpm 4 °C 離心 10 分鐘。吸去上清液，以 10 mL 冰的無菌去離子水沖散細胞沉澱，再以 6500 rpm 4 °C 離心 10 分鐘。吸去上清液，加入 5 mL 冰的 10% glycerol 沖散細胞沉澱，以 6500 rpm 4 °C 離心 20 分鐘。吸去上清液，加入 1.5 mL 冰的 10% glycerol 沖散細胞沉澱，分裝 150 μ L 至無菌微量離心管中，並快速置於液態氮中，再存於 -80 °C 冰箱，以備進行轉型作用。整個製備過程皆需於 4 °C 及冰上操作，且過程宜快速精準。

5-2 青枯病菌勝任細胞的轉型作用

取 2 μL 質體 DNA 和 150 μL 青枯病菌勝任細胞置於 1.5 mL 微量離心管中，並充分混合，吸出置於細胞電穿孔小管中，通以 2.5 KV 的電流。以 1 mL 523 液體培養基混合吸出菌液，注入微量離心管中，置於 28 $^{\circ}\text{C}$ 下震盪培養 3 小時，再將菌液塗盤於具篩選力的固體培養基上，置於 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培養兩到三天。

6. 製備 allelic mutants

將青枯病菌 (Pss4、Pss1308) 利用 MP 液體培養基在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下 200 rpm 震盪培養兩天。取 40 μL 的菌液和 5 μL 的 genomic DNA 充分混合均勻，點盤於 BG 固體培養基 (不須添加 glucose) 上，置於 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培養兩天，利用無菌去離子水將培養基上之菌清洗下來，放入微量離心管中，低速離心後，去除上清液，混合剩餘的液體與細胞沉澱。將混合好的菌液塗佈於具篩選力的 TTC 固體培養基 (抗 Kan)，於 28 $^{\circ}\text{C}$ 下培養兩天。

7. RNA 表現的測定

7-1 萃取青枯病菌的 RNA (使用 RNeasy Mini Kit, Invitrogen)

挑單一青枯病菌菌落放入加 20mM glutamate 的 MP 液體培養基(Boucher et al., 1985)，在 28 $^{\circ}\text{C}$ 下 200 rpm 震盪培養，直至菌液濃度到達 $\text{OD}_{600}=0.8$ ，取 1.5 mL 的菌液至微量離心管，加入 5% 的 STOP solution (95% ethanol、5% phenol)，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 6000 rpm 離心 10 分鐘，去上清液，加入 200 μL TE buffer 和 2 μL 的 lysozyme (0.1 mg/ μL)，充分混合均勻後，靜置 5 分鐘，加入 700 μL RLT buffer (含 7 μL β -mercaptoethanol)，充分混合均勻後，以 13000 rpm 離心 5 分鐘，將上清液小心移至新的微量離心管，再加入 500 μL 的 100% ethanol，輕搖混合後，將其移至 QIAshredder spin column，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，加入 350 μL RW1 buffer 到 column，再以 13000 rpm 離心 1 分鐘，然後小心的在 column 上加入 70 μL 的 RDD buffer 和 10 μL 的 DNase，靜置 1hr 後，加入 350 μL 的 RW1 buffer 清洗 RNeasy spin column，以 13000 rpm 離心 1 分鐘後，加入 500 μL RPE buffer 清洗兩次，離心後去除 RPE buffer，再以 13000 rpm 離心 2 分鐘去除 column 中殘餘的酒精，將清洗

後的 RNeasy spin column 置入新的微量離心管，加入 20 μL DEPC 水，以 13000 rpm 離心 1 分鐘，即可得青枯病菌 RNA 樣本。

7-2 甲醛電泳膠體製備 (1% formaldehyde gel)

取 1 g 的 agarose 加入 37 mL 無菌去離子水，微波加熱使之完全溶解後，待冷卻至 70-80 $^{\circ}\text{C}$ ，加入 5 mL 的 10x MOPS 及 8 mL 的 37% 甲醛混合均勻後倒入模具中，插入齒梳後待冷卻凝固備用。取 1-2 μL total RNA，2 μL 10x MOPS，3 μL 的 37% 甲醛，10 μL 的 formamide 及 1 μL 的 EtBr (10 mg/mL)，混合後於 75 $^{\circ}\text{C}$ 加熱 10 分鐘，在冰上急速冷卻後，以微量吸管將 total RNA 樣品注入膠體中，以電壓 70-80 伏特進行電泳跑膠。

7-3 反轉錄聚合酶連鎖反應 (RT-PCR)

本實驗使用的試藥組為 Promega kit。利用總核糖核酸中的 mRNA 後面帶有 poly A tail，而用 Oligo (dT)₁₅ 當作引子合成 cDNA。製備方式如下，取 1 μg 的 RNA，加入 2 μL 的 dNTP mix (10 mM)、1 μL 的 Random primer (0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)、2 μL 的 10x reverse transcription buffer、4 μL 的 MgCl_2 (25 mM)、0.4 μL 的 AMV reverse transcriptase (15U/ μL) 及 0.4 μL recombinant RNasin ribonuclease inhibitor，最後補水至總體積 20 μL 後，置於 42 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 小時，再將整個反應 95 $^{\circ}\text{C}$ ，加熱 5 分鐘，之後置於冰上 5 分鐘，停止反應，補 DEPC 水至總體積 100 μL ，將 cDNA 冰-20 $^{\circ}\text{C}$ 備用。

7-4 即時定量 RT-PCR

使用 Bio-Rad Real-Time PCR Detection Systems，cDNA 取 5 μL (約 500 ng/ μL)，9 μL SYBR Green Supermix，0.5 μL 的 forward primer (10 μM)，0.5 μL 的 reverse primer (10 μM)，補無菌去離子水至總體積為 18 μL ，混合均勻後放入 Real-Time PCR Detection 反應器中進行反應，再經 iQ5 軟體分析。

8. 生理特性分析

8-1 生長曲線

挑單一菌落到 523 液體培養基 200 rpm 震盪培養 16 小時，利用分光光度計

(HITACHI-3200) 測量其吸光值 OD_{600} ，取 $100 \mu L$ 的 $OD_{600}=0.3$ (菌量大約為 3×10^8 CFU/mL) 菌液到 523 或 M9 液體培養基 $100 mL$ 中，於 28 $^{\circ}C$ 轉速 200 rpm 的培養箱中震盪培養，每十二小時取 $1 mL$ 的菌液出來測量其吸光值 OD_{600} 並記錄之。

8-2 點盤分析

挑單一菌落至 523 液體培養基，於 28 $^{\circ}C$ 以 200 rpm 震盪培養 16 小時，利用分光光度計 (HITACHI-3200) 測量其吸光值 OD_{600} ，首先將菌液調到 $OD_{600}=0.3$ (3×10^8 CFU/mL)，再做一系列的系列稀釋，取 $10 \mu L$ 濃度分別為 3×10^5 、 3×10^4 、 3×10^3 CFU/mL 的菌液點在 CPG、CPG+0.01%SDS、M9、SM1 固體培養基上，放在 28 $^{\circ}C$ 的培養箱養兩天，拍照觀察其生長是否有異。

8-3 青枯病菌在植物體內增生能力分析

挑單一菌落至 523 液體培養基，於 28 $^{\circ}C$ 以 200 rpm 震盪培養 16 小時，利用分光光度計 (HITACHI-3200) 測量其吸光值 OD_{600} ，將菌液調到 $OD_{600}=0.3$ ，以針筒打入菸草 *Nicotiana benthamiana* (Nb) 的葉肉組織中，在菌液進入植物組織後的 0hr 和 24hr 分別以打洞器取含菌液植物組織，將待測植株組織放入封口袋中秤重，加入 $1 mL$ 的無菌水，將植株磨碎，取 $100 \mu L$ 的組織液出來，作連續十倍稀釋，再將不同倍數的稀釋液各取 $10 \mu L$ 點盤於 TTC+kanamycin 或 SM1 固體培養基上，兩天後數其菌落數，並回推其在植物中的菌量。

8-4 逆境反應分析 Stress response (Branch et al., 1965)

挑單一菌落養在 523 液體培養基，於 28 $^{\circ}C$ 以 200 rpm 震盪培養 16 小時，利用分光光度計 (HITACHI-3200) 測量其吸光值 OD_{600} ，將菌液調到濃度 $OD_{600}=0.3$ 。將待測的逆境化學物(如：過氧化氫、抗生素 polymycin B)加入 523 營養豐富或 MP 營養貧瘠液體培養基中，再做一系列的兩倍系列稀釋，各取含有不同濃度化學物的 523 或 MP 液體培養基 $2 mL$ 放入試管中，並保留一管未加任何化學物之純液體培養基當做對照組，將 $50 \mu L$ $OD_{600}=0.3$ 之菌液加入各試管中，於 28 $^{\circ}C$ 轉速 200 rpm 的培養箱中震盪培養，523 培養基於 16 小時後取出，MP 培養基於 30 小時後取出，菌液利用分光光度計 (HITACHI-3200) 測量其吸光值 OD_{600} ，並紀錄比較之。

8-5 細菌碳源、氮源 (BiologTM) 和 API-Zym 酵素的分析

挑單一菌落培養在 TTC 固體培養基上，放在 28 $^{\circ}C$ 的培養箱培養一天，用 BiologTM 商業套組中所附的培養液 GN Inoculating Fluid (Biolog catalog # 72101)

將次培養之菌洗下，並分別取150 μL $\text{OD}_{600}=0.3$ 的含菌培養液加入GN2 MicroPlate (Biolog catalog # 1101)的每一個孔洞中，放在28 的培養箱養一天，利用ELISA reader (Beckman Culter AD340)測量其吸光值 OD_{570} ，紀錄其菌液濃度，以分析此菌的碳源利用。APIZym酵素測試是使用商業套組(bioMerieux Vitek, St Louis, MO, USA)來進行實驗，首先取 $\text{OD}_{600}=1$ 的菌液加入APIZym kit的待測酵素孔洞中，靜置培養於28 4hr後，再待測孔洞中滴一滴A試劑，再滴一滴B試劑，靜置30分鐘，照相記錄其顏色變化。

8-6 穿透式電子顯微鏡

挑單一菌落培養在 TTC 固體培養基上 16 小時，用無菌去離子水將培養基上的菌清洗下來，取 10 μL 的菌液滴在 carbon-coated copper grid (100-200 目) 靜置 40 秒，以無菌濾紙吸去菌液，再滴 10 μL 的 1% phosphotungstic acid 靜置 30 秒，以無菌濾紙吸去 phosphotungstic acid，靜置一段時間待 carbon-coated copper grid 乾燥後，即可用穿透式電子顯微鏡(Hitachi H-7650)觀察青枯病菌的細胞型態。

9. 青枯病菌致病力相關能力之分析

9-1 游動能力的測試【Swimming motility (Liu et al., 2005) and Twitching motility】

挑單一菌落培養在 TTC 固體培養基上 16 小時，用無菌去離子水將培養基上的菌洗下來，利用分光光度計(HITACHI U-3200)測量其吸光值 OD_{600} ，取 1 μL $\text{OD}_{600} = 1$ 的菌液滴在 0.3% 的洋菜膠培養基上(含 1% 的 tryptone)，放於 28 的培養箱中培養 48 小時，拍照並記錄其 swimming motility 游動半徑。挑單一菌落培養在 CP 固體培養基(1% peptone, 0.1% casein hydrolysate, 0.5% glucose)上，在培養 18、24、28 小時時利用解剖顯微鏡觀察其單一菌落的 twitching motility 型態。

9-2 番茄根部的附著力測試 (Jofre et al., 2004)

將感病品種 L390 的番茄種子放入無菌水中，以轉速 80 rpm 震盪兩天，再將發根的番茄種子移到鋪有一層 3M 濾紙的 15 公分培養盤上，加少許無菌去離子水保持種子濕潤，並且外套一層鋁箔紙，置於暗室培養兩天。取於 28 200 rpm 震盪培養 16 小時的菌液，利用分光光度計 (HITACHI U-3200) 測量其吸光值 OD_{600} ，

取 400 μL $\text{OD}_{600}=0.3$ 的菌液稀釋一百倍，將稀釋後 40 mL 的菌液倒入直徑 16 公分的培養皿中，取上述五株四天大的番茄幼苗放入含菌液的培養皿中，培養在 28 $^{\circ}\text{C}$ 轉速 50 rpm 下四小時。將每株番茄的根部切取兩公分，放入 30 mL 0.88% 氯化鈉溶液中，以轉速 200 rpm 清洗番茄幼根 30 秒，再將根放入 1 mL 的 0.88% 氯化鈉溶液中，震盪 20 秒混和均勻，分別稀釋十倍、一百倍後，取 50 μL 塗在 TTC 或 SM1 固體培養基上，兩天後計算其菌落數。

9-3 生物膜形成能力之分析

挑單一菌落至 523 液體培養基 200 rpm 震盪培養 16 小時，利用分光光度計 (HITACHI U-3200) 測量其吸光值 OD_{600} ，取 20 μL $\text{OD}_{600}=0.1$ 的菌液到每個孔洞含有 180 μL BG 液體培養基的 96 孔盤中，靜置於 28 $^{\circ}\text{C}$ 的培養箱一天。然後將其孔中的菌液混和均勻，利用 ELISA reader (Beckman Coulter AD340) 測量其吸光值 OD_{570} ，紀錄其菌液濃度。再將孔內的菌液吸出，加入 200 μL 的無菌水將孔壁洗過，再加入 200 μL 1% 的結晶紫染色十分鐘，吸出結晶紫後，用 200 μL 的無菌水將孔壁洗過，再加入 200 μL 1% SDS 充分混和均勻，將管壁上結晶紫染的生物膜洗下，利用 ELISA reader (Beckman Coulter AD340) 測量其吸光值 OD_{570} ，紀錄其生物膜形成能力。

9-4 胞外酵素 (Exoenzyme activity) 的分析 (Liu et al., 2005; Valls et al., 2006)

挑單一菌落至 523 液體培養基，於 28 $^{\circ}\text{C}$ 以 200 rpm 震盪培養 16 小時，利用分光光度計 (HITACHI U-3200) 測量其吸光值 OD_{600} ，取 1 μL $\text{OD}_{600}=1$ 的菌液分別點在含有不同胞外酵素的固體培養基上，放在 28 $^{\circ}\text{C}$ 的培養箱養兩天。兩天後將培養基取出作染色分析，加入 2 N HCl 去分析分別含有胞外酵素 pectin methylesterase (Pme) 和 polygalactouronase (Peh) 的培養基，計算酵素分解暈環的半徑大小。至於分析含有胞外酵素 endoglucanase (Egl) 的培養基，首先先加入可以蓋過整個培養基面積的 0.1% 剛果紅溶液，靜置 15 分鐘後將溶液倒出，再加入 1 M 的氯化鈉溶液，數分鐘酵素分解暈環出現後，倒出溶液，計算酵素分解暈環的半徑大小。

9-5 菸草的反應測試

挑單一菌落至 523 液體培養基，於 28 $^{\circ}\text{C}$ 以 200 rpm 震盪培養 16 小時，利用分

光光度計(HITACHI U-3200)測量其吸光值 OD_{600} ，將菌液調到濃度 $OD_{600}=0.3$ 。將菌液以針筒打入菸草 Wisconsin 38 (W38)的葉肉組織中，24 小時後，觀察其反應並照相紀錄之。本實驗也將菌液以針筒打入菸草 *N. benthamiana* 的葉肉組織中，並於 24、72 小時觀察其反應並照相紀錄之。

9-6 番茄病原性測試 (Jaunet and Wang, 1999)

所用來測試的番茄品系是青枯病菌感病品種(*Solanum esculentum*) L390，首先將番茄泡水放在轉速 80 rpm 震盪器上兩天，使其種子發芽，再移到兩英寸花盆中生長，於 12 小時光照 25℃，12 小時黑暗 20℃ 培養，等番茄三週大後，即可用來測試青枯病的致病力，每次實驗中每一青枯病菌使用六棵番茄作測試。

挑單一菌落至 523 液體培養基，於 28℃ 轉速 200 rpm 的培養箱中震盪培養 16 小時後，取 200 μ L 的菌液均勻塗於 523 固體培養基上，放在 28℃ 的培養箱養一天，用無菌水將培養基上的菌液洗下，利用分光光度計(HITACHI U-3200)測量其吸光值 OD_{600} ，將菌液調到濃度 $OD_{600}=0.3$ 。每棵番茄澆灌 20 mL 濃度 $OD_{600}=0.3$ 的菌液，放入溫度 26℃ 的生長箱七日，紀錄其萎凋指數，萎凋指數共分 0 到 5 級，第 0 級即毫無病徵，第 1 級即一片葉子萎凋，第 2 級即兩到三片葉子萎凋，第 3 級即除了頂葉沒有萎凋外其他葉子皆萎凋，第 4 級即整棵植物萎凋，第 5 級即植物已經腰折乾枯死亡。

除了紀錄萎凋指數外，我們亦計算植株內真正的細菌含量，我們將測距離子葉上下 1 公分處的組織，上部稱為莖部，下部稱為基部，除此我們亦測植株的根部菌量，我們也將其根部分為上下兩部份，將待測植株組織放入封口袋中秤重，加入 1 mL 的無菌水，將植株磨碎，取 100 μ L 的組織液出來，作連續十倍稀釋，再將不同倍數的稀釋液各取 10 μ L 點盤於 TTC+Kan 或 SM1 固體培養基上，兩天後數其菌落數，並回推其在植物中的菌量。

10. 青枯病菌脂多醣的測定

10-1 青枯病菌脂多醣的萃取(Titareuko et al., 1997)

從挑單一菌落至 523 液體培養基，於 28℃ 以 200 rpm 震盪培養 16 小時，取 200 μ L 的菌液均勻塗於 TTC 固體培養基上，放在 28℃ 的培養箱養一天，用無菌水將培養基上的菌液清洗下，利用分光光度計(HITACHI U-3200)測量其吸光值 OD_{600} ，將菌液調到濃度 $OD_{600}=0.4$ ，取 1.5 mL 到微量離心管，以轉速 13000 rpm 離心十分鐘，去除上清液，加入 50 μ L 的 lysis buffer (2% SDS, 4%

2-Mercaptoethanol, 10% glycerol, 1 M Tris PH=6.8), 充分混合均勻後, 放入 100 乾浴槽加熱十分鐘, 再加入 RNase A (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 2 μL 和 DNase 5U, 置於 37 乾浴槽處理 30 分鐘, 加入 2 mg/mL Proteinase K 2 μL , 置於 60 乾浴槽兩小時, 再放入 100 乾浴槽加熱十分鐘, 再次加入 2 mg/mL Proteinase K 2 μL , 置於 60 乾浴槽兩小時, 即可將萃取的脂多醣保存於-20 備用。

10-2 一維電泳 (SDS-PAGE) 的製備

將玻璃板清拭乾淨, 以塑膠模型組合好, 並放於墊片上, 以塑膠支架支撐。再依附錄中所示之用量配製膠體溶液, 將 separating gel 混勻, 注入 8 mL 於模型中, 用 1 mL 100% 酒精壓平。待膠體凝固後, 去除酒精並用去離子水清洗過, 再將 stacking gel 加入並插上槽梳, 待凝固後, 去除槽梳, 將脂多醣樣本混合脂多醣染色劑注入孔洞中, 以 70V 跑約 2.5 小時。

10-3 青枯病菌脂多醣銀染分析

將電泳後的膠體拆下浸泡於 40 mL 固定液(含 40% ethanol 及 10% acetic acid) 緩慢搖動一小時, 之後倒出固定液, 加入 40 mL 的過碘酸氧化溶液(1.4% periodic acid 及 40% ethanol 及 5% acetic acid), 氧化作用五分鐘, 倒出過碘酸氧化溶液後, 以 50 mL 二次水清洗膠體三次, 每次以 80 rpm 震盪清洗 15 分鐘, 清洗完後, 加入硝酸銀銻合物溶液(取 1 克硝酸銀溶於 5 mL 的二次水中, 另取 1M 的 NaOH 2 mL 和 NH_4OH 2.6 mL 到 41 mL 的二次水中, 將硝酸銀液緩慢滴至鹼性氨水中使其完全溶解), 使其作用 15 分鐘, 之後以 50 mL 的二次水清洗膠體三次, 每次以 80 rpm 震盪清洗 10 分鐘, 清洗完之後, 加入 50 mL 呈色液(含 500 μL 1% citric acid 及 25 μL 37% formaldehyde), 搖動至呈色接近滿意時, 倒出呈色液並以二次水簡易沖洗後, 倒入 1% acetic acid 停止染色, 膠體掃描存檔封膠保存。

11. β -galactosidase activity assay (Miller,1972)

挑單一菌落至 523 液體培養基, 於 28 以 200 rpm 震盪培養 16 小時, 利用分光光度計(HITACHI U-3200)測量其吸光值 OD_{600} , 將菌液調到濃度 $\text{OD}_{600}=0.1$ 。取 2 mL $\text{OD}_{600}=0.1$ 的菌換到 MP 液體培養基中, 於 28 以 200 rpm 震盪培養 5 小時後, 取 1.5 mL 的菌以 13000 rpm 離心後, 去除上清液, 加入 1500 μL Z buffer, 充分混合均勻, 取 750 μL 利用分光光度計(HITACHI U-3200)測量其吸光值 OD_{600} , 紀錄菌液生長濃度。將剩下的 750 μL Z buffer 移到新的微量離心管中, 加入 100 μL 的 chloroform 和 50 μL 0.1% SDS, 充分震盪均勻 10 秒後, 放入 28 乾浴槽作用 5

分鐘，加入 150 μL 的 ONPG 開始進行反應，紀錄其開始時間 t_0 ，等其變成黃色後，加入 375 μL 的 1 M Na_2CO_3 並置於冰上停止其反應，紀錄其結束時間 t_f 。將微量離心管以 13000 rpm 離心 10 分鐘後，取其上清液，利用分光光度計(HITACHI U-3200)測量其吸光值 OD_{550} 和 OD_{420} ，並利用下列公式計算其 β -galactosidase activity。

$$\frac{(\text{O.D.}_{420} - 1.75 \times \text{O.D.}_{550}) \times 1000}{\text{O.D.}_{600} \times 750 \times (t_f - t_0)}$$



第三章 結果

I、RSc0411 基因之功能分析

1、生物資訊分析 (bioinformatics)

為了解 RSc0411 基因之功能，本論文利用 NCBI 資料庫做此蛋白質胺基酸序列比對，發現 RSc0411 屬於未知功能的 DUF1239 蛋白群，DUF1239 蛋白大都分佈在微生物，尤其廣泛分佈在細菌中(附錄三)。目前屬於此蛋白群的 *E. coli* LptC 已知為膜蛋白，且參與 LPS 的生合成與運送。將 RSc0411 胺基酸序列利用電腦軟體 TMHMM-2.0 比對，可預測其蛋白 N 端有一 transmembrane domain，表示其為一個膜蛋白(附錄四)。

2、RSc0411 突變株之生理與生化特性分析

2-1. 生長曲線

RSc0411 突變株和野生型菌株在營養貧瘠液體培養基 M9 中生長曲線並無明顯差異(圖一)，而且其在營養貧瘠固體培養基上生長速度也無明顯差異(圖二)，但是 RSc0411 突變株在營養豐富固體培養基上生長速度比野生型菌株略慢(圖二)。為更進一步的確認 RSc0411 突變株和野生型菌株在植物體內增生能力是否有異。將 RSc0411 突變株和野生型菌株以針筒直接注入於菸草 *N. benthamiana* 葉肉組織中，於 0 與 24 小時取菸草組織測植物體內青枯病菌菌量。如圖三所示，RSc0411 突變株和野生型菌株在菸草 *N. benthamiana* 內增生能力無明顯差異。由此可以確認 RSc0411 突變株並非是因為生長能力有問題，而造成其致病力降低。

2-2. 逆境反應分析

由電腦軟體的比對，RSc0411 蛋白預測為膜蛋白，因此本實驗將利用幾種與細胞結構相關的逆境固體培養基來做測試，發現 RSc0411 突變株在含多種抗生素的 SM1 培養基與外加 SDS 的 CPG 培養基上有明顯生長抑制的情況(圖二)。我們進一步利用最小抑制生長濃度(MIC)檢測 SM1 中所含的抗生素 polymyxin B (可用來檢測 LPS 及膜完整性)及 tyropricin (可用來檢測膜完整性)之抗性，發現野生型

菌株在 tyrothricin 逆境下最小抑制濃度為 1.25 ppm，但 *RSc0411* 突變株最小抑制濃度只有 0.16 ppm。在 polymyxin B 逆境下，野生型菌株最小抑制濃度為 800 ppm，但 *RSc0411* 突變株最小抑制濃度只有 200 ppm(表二)，表示 *RSc0411* 突變株之細胞膜組織完整性已有缺陷。本論文亦測試其他的逆境，在 chloramphenicol(檢測蛋白質穩定性)逆境下，野生型菌株 Pss190 最小抑制濃度為 25 ppm，而 *RSc0411* 突變株最小抑制濃度為 12.5 ppm，差異不大。在 H₂O₂ 氧化逆境下，野生型菌株和 *RSc0411* 突變株最小抑制濃度皆為 0.03 mM，並無顯著差異(表二)。

2-3. API-Zym 酵素的分析

本實驗利用 API-Zym 商業套組進行分析青枯病菌 *RSc0411* 突變株的各類水解酵素(hydrolytic enzymes)之活性，由實驗結果(表二)可知野生型菌株和 *RSc0411* 突變株水解酵素的分泌並無顯著差異，*RSc0411* 基因並無參與水解酵素的分泌，*RSc0411* 突變株代謝相關酵素皆正常分泌。

2-4. 細胞膜形態的觀察

因為電腦軟體的比對及 *RSc0411* 突變株對細胞膜逆境的最小抑制濃度明顯下降，本研究推測 *RSc0411* 為膜蛋白，為分析青枯病菌 *RSc0411* 突變株之細胞膜形態是否改變，本研究以穿透式電子顯微鏡(TEM)觀察並比較其各種細胞膜形態。由實驗結果(圖四)可知野生型菌株和 *RSc0411* 突變株的細胞膜形態沒有明顯差異。

3、*RSc0411* 突變株致病力相關能力之分析

3-1. 細菌游動能力的測試

本實驗測試青枯病菌 *RSc0411* 突變株的游動能力是否降低而影響其致病力，游動能力分為 swimming 和 twitching，其中 swimming 為測試細菌在水中的游動力，因此利用 0.3% agar 培養基來模擬在水中的環境，twitching 則是測試細菌在固體上的泳動能力，所以利用 1.5% agar 模擬細菌在固體上的泳動力。青枯病菌野生型菌株 Pss190 和其 *RSc0411* 突變株在 0.3% agar 上皆沒有 swimming 能力(圖五)，但兩者皆有 twitching 能力(圖六)。

3-2. 番茄根部的附著力測試

本實驗將測試青枯病菌 *RSc0411* 突變株附著於番茄根部的能力是否降低而影響其致病力。與野生型菌株相比，*RSc0411* 突變株附著於番茄根部能力明顯降低(圖七)。

3-3. 生物膜形成能力之分析

青枯病菌可藉由生物膜形成的能力而忍受外在環境逆境，使得病菌在逆境下得以生存下來，這對於青枯病菌的致病力是非常重要的。因此本實驗將測試青枯病菌 *RSc0411* 突變株生物膜形成能力是否有改變，由實驗結果(圖八)可知與野生型菌株相比，*RSc0411* 突變株生物膜形成能力有明顯下降的趨勢。

3-4. 胞外酵素的分析

為了測試青枯病菌分泌破壞寄主植物細胞壁的酵素 (Pme、Peh、Egl) 是否有異，進而影響其致病力，所以本篇論文進行野生型菌株和 *RSc0411* 突變株胞外酵素的分析。由實驗結果(表二)可知野生型菌株和 *RSc0411* 突變株的胞外酵素 (Pme、Peh、Egl) 分泌能力沒有明顯差異。

3-5. 菸草的反應測試

本論文利用菸草 Wisconsin 38 (W38) 和 *N. benthamiana* 來測試 *RSc0411* 突變株的第三型分泌系統是否有所缺失，由實驗結果(圖九)可知，W38 在注入青枯病菌野生型菌株 24 小時後即有過敏性反應的產生，但是 *RSc0411* 突變株喪失誘導菸草 W38 產生過敏性反應。*N. benthamiana* 在注入野生型菌株 24 小時後並無任何反應，但在 72 小時後發現葉片有組織壞死(necrosis)產生，但是 *RSc0411* 突變株只有黃化現象(chlorosis)。

3-6. 番茄病原性測試

實驗室前人採用跳躍子(Tn5)策略製造數千株隨機青枯病菌突變株(Lin et al., 2008)。其中 *RSc0411* 突變株在阿拉伯芥和番茄上無致病力，本論文將探討並確認 *RSc0411* 突變株在番茄上的致病力，由實驗(圖十 A)可知番茄澆灌野生型菌株 Pss190 後七日的萎凋指數為 4.5，但澆灌 *RSc0411* 突變株的萎凋指數為 0，為了更進一步檢測 *RSc0411* 突變株是否完全失去入侵植物的能力或者在入侵植物後無法在植物內遽量增生感染植株，所以進行番茄植株不同部位的菌量測定，由實驗結果(圖十 B)可知野生型菌株在植株不同部位組織內(根的上部、根的下部、莖基部、

莖部)的菌量皆到達 10^8 CFU/g 以上。但 *RSc0411* 突變株卻只有在根的上、下部測到約 10^6 CFU/g 的菌量，植株的莖基部、莖部皆無測到青枯病菌，代表 *RSc0411* 突變株在植株各部位中的感染與移動能力都顯著低於野生菌株。

4、驗證 *RSc0411* 基因功能

4-1. 構築 isogenic 突變株

為了驗證的確是由這個跳躍子插壞基因而造成上述許多致病能力的改變，我們利用自然轉型(natural transformation)的方法(Bertolla et al., 1997)將跳躍子置換到另一台灣本土野生型青枯病菌 Pss4 (phylotype I strain)，分析是否有如同 Pss190 背景下的 *RSc0411* 突變株所發現的 phenotype。由實驗結果(圖二)可知 Pss4 背景下的 *RSc0411* 突變株在含多種抗生素的 SM1 培養基與外加 SDS 的 CPG 培養基上有明顯的生長抑制的現象，在番茄根部的附著能力亦有顯著的下降(圖七)。而 Pss4 的 *RSc0411* 突變株 swimming 能力只有野生型菌株 Pss4 的 77% (圖五)。但 Pss4 的 *RSc0411* 突變株生物膜形成能力與野生型菌株無異(圖八)，且皆無法在感染菸草 W38 葉片 24 小時後，誘導產生過敏性反應，在感染 *N. benthamiana* 72 小時後皆有組織壞死(necrosis)產生。

4-2. 互補株的構築與分析

為了更進一步確認 *RSc0411* 缺失會造成青枯病菌致病力缺失。本論文利用低拷貝數之泛寄主質體 pUFR047 進行基因功能性互補試驗，將野生型菌株 Pss190 和 Pss4 的 *RSc0411* 互補到 Pss190 背景下 *RSc0411* 突變株中，發現在此突變株中表達單獨野生型 *RSc0411* 即可回復在幾種與細胞結構相關的逆境固體培養基之正常生長(圖二)和生物膜形成的能力及番茄的根部附著能力(圖七、八)，並且完全恢復在番茄上之致病力、誘導菸草 W38 產生 HR 反應之能力(圖九)和誘導 *N. benthamiana* 72 小時後產生組織壞死(necrosis)。

5、判定青枯病菌 *RSc0409~RSc0413* 之操縱子 (operon) 結構

依照基因組已經定序完全的 GMI1000 基因組資訊，在 *RSc0411* 之前後有數個轉錄相同方向的未知功能基因群，然而，這些基因是組成單獨或數個操縱子 (operon) 則尚未知。為了解 *RSc0411* 基因與附近之基因的組成結構與調控，本論文將利用 promoter assay 研究策略，在野生青枯病菌菌株中判定 *RSc0409~RSc0413* 之

操縱子結構。由實驗結果(圖十一)可知在對數生長期時 *RSc0411* 和 *RSc0413* 基因前端有強烈的啟動子，*RSc0409~RSc0411* 為一操縱子，而 *RSc0412~RSc0413* 為另一個操縱子。

6、青枯病菌脂多醣的測定

青枯病菌的 *RSc0411* 與參與大腸桿菌 LPS biogenesis 的 *LptC* 同屬於 DUF1239 家族，但胺基酸序列的相似度卻不高 (identity 18%, similarity 35%) (圖十二)。因此，進一步測試青枯病菌之 *RSc0411* 基因是否參與調控 LPS biogenesis。由實驗結果(圖十三)可知與野生型菌株相比，*RSc0411* 突變株的粗型脂多醣(R-LPS)明顯降低，但平滑型脂多醣(S-LPS)則無明顯差異，而對照組 LPS 生合成基 *rfaF* 突變株無法產生粗型脂多醣與平滑型脂多醣(圖十三)，所以可知 *RSc0411* 基因與 R-LPS 的生合成相關。

7、以比較生物資訊學探討 DUF1239 基因群及協助 LPS 運送相關蛋白群

近年來，已有許多原核及真核生物的基因組被解序完畢，並且各生物之 DNA 晶片及各式蛋白質結構資料庫也快速成長，相關資訊極為豐富，有利於進行 *in silico* comparative functional study。由於青枯病菌 *RSc0411* 基因產物隸屬於功能未知的 DUF1239 蛋白家族，且獨特並廣泛分布於細菌中，為分析 DUF1239 蛋白家族之可能功能，我們比較在各種細菌中與 DUF1239 homologues 相關之操縱子結構(operon organization)及基因成員之異同。由圖十四可知除了 *RSc0412* (*kdsC* 或 *ybr1*) 在 *Ralstonia metallidurans* CH34 (*Rme*)、*Ralstonia eutropha* H16 (*Reu*)及 *Cupriavidus taiwanensis* (*Ct*)中找不到對應的同源基因外，*RSc0411* 附近之基因的組成與其他細菌皆相似，其中 *RSc0413*、*RSc0412* 對應大腸桿菌的 LPS 生合成基因 *kdsD*、*kdsC* (Meredith and Woodard 2003; Wu and Woodard 2003)，而 *RSc0410*、*RSc0409* 對應大腸桿菌的 LPS 運送基因 *lptA*、*lptB*。在青枯病菌中 *RSc0408*、*RSc0409*、*RSc0412* 和 *RSc0413* 的序列與其他細菌所對應的同源基因相似度高(similarity 至少達 60%)，而 *RSc0410* 和 *RSc0411* 的序列只與 *R. metallidurans* CH34 (*Rme*)、*R. eutropha* H16

(*Reu*)及 *C. taiwanensis* (*Ct*)有高度相似性(similarity 達 70%)，和其他細菌所對應的同源基因相似性低(similarity 低於 50%)。

此外，由表三可知，青枯病菌 lipid A 生合成蛋白群的序列與其他細菌所對應的同源基因相似度極高(similarity 至少達 50%)，但其核心多醣(core)生合成蛋白群的序列只有 RfaF 和 WaaG 與親緣相近之細菌(*Rme*、*Reu*、*Ct*)相似度較高，其他蛋白與其所對應的同源基因相似度都極低。青枯病菌協助運送 LPS 的蛋白群中，除了 LptB 和 MsbA (ABC transporter)蛋白在所有細菌中序列相似度高達 60%外，其他蛋白與其親緣相近之細菌(*Rme*、*Reu*、*Ct*)相似度達 60%以上，但與其他親緣關係較遠的細菌(*Xcv*、*Ecc*、*E. coli*)相似度則幾乎低於 50%。青枯病菌 O-antigen 連接蛋白與其他細菌所對應的同源基因相似度都極低。

8、同源基因互補株的構築與分析

由於 *RSc0411* 屬於未知功能蛋白 DUF1239 家族，本研究分析源自其他生物 DUF1239 之功能是否與青枯病菌 *RSc0411* 具相同功能。根據資料庫序列資料，設計適合之引子(附錄一)，以 PCR 擴增出各種生物中之 DUF1239 基因全長序列，利用低拷貝數之泛寄主質體 pUFR047 當作載體，將之送入青枯病菌 *RSc0411* 突變株，構築互補株。所得之互補株將依據上述之各種青枯病菌特性測試，以判斷源自不同生物之 DUF1239 基因之功能及特性是否與青枯病 *RSc0411* 類似，藉以初步推斷這些基因之可能功能。本實驗用來進行互補試驗的 DUF1239 基因序列將分別分離自 *E. coli*、*Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria* (*Xcv*)、*Erwinia carotovora* subsp. *Carotovora* (*Ecc*)、*Ralstonia metallidurans* CH34 (*Rme*)、*Ralstonia eutropha* H16 (*Reu*) 及 *Cupriavidus taiwanensis* (*Ct*)。將上述菌種的同源基因與青枯病菌的 *RSc0411* 做胺基酸序列比對，明顯的分為兩群，一群是和 *RSc0411* 有高度的相似性(*Rme*、*Reu*、*Ct*)，另一群則與 *RSc0411* 相似度低 (*Xcv*、*Ecc*、*E. coli*)。由實驗結果(圖二)可知，互補胺基酸相似度高的菌種 *Rme*、*Reu*、*Ct* 可以回復 *RSc0411* 突變株在 SM1 培養基上之正常生長、誘導菸草 W38 產生 HR 反應之能力及誘導 *N. benthamiana* 72 小

時後產生組織壞死 (necrosis)，但互補胺基酸相似度低的菌種 *Xcv*、*Ecc*、*E. coli* 則無法回復突變株的這些缺失。

9、*RSc0411* 參與第三型分泌系統

由於 *RSc0411* 突變株喪失誘導菸草產生 HR 反應之能力，推測 *RSc0411* 突變可能影響第三型分泌系統，進而影響青枯病菌的致病力。為了進一步確認 *RSc0411* 是否參與青枯病菌的第三型分泌系統，本研究以目前研究已知的第三型分泌系統重要調控基因 *hrpG* 突變株當作對照組，以定量 RT-PCR 比較野生株 Pss190、*RSc0411* 突變株的第三型分泌系統相關基因之 (*hrpB*、*hrpY*、*popA* 與 *popC*) RNA 表現量是否有降低。由實驗結果(圖十五)可知 *RSc0411* 突變株 *hrpB*、*hrpY*、*popA*、*popC* 基因的 RNA 表現量明顯比野生型菌株降低許多，而對照組 *hrpG* 突變株的這些基因 RNA 表現量亦明顯下降，由此推測 *RSc0411* 可能參與青枯病菌的第三型分泌系統，調控第三型分泌系統基因 *hrpB*、*hrpY*、*popA*、*popC*，其中 *hrpB* 為目前研究青枯病菌第三型分泌系統主要調控者 *hrpG* 的下游基因。我們推測 *RSc0411* 可能位於三種位置，其一位於調控者 *hrpG* 的上方，可以調控 *hrpG*，其二位於 *hrpG* 和 *hrpB* 之間，其三可能是藉由其他非 *hrpG* 的調控路徑直接或間接調控 *hrpB*，進而影響第三型分泌系統。

為了進一步的確認 *RSc0411* 在第三型分泌系統途徑的正確位置，本研究使用 promoter assay 的方式分析，由實驗結果(圖十六)可知利用質體 pCZ962 當作載體將 *RSc0411* 的啟動子放入野生型菌株 Pss190 中可以強烈的啟動 LacZ 活性，但是將 *RSc0411* 的啟動子放入 *hrpG* 突變株中，LacZ 活性明顯下降，因此推測 *RSc0411* 受到 HrpG 的調控，直接或間接調控 *hrpB* 而影響青枯病菌致病力，至於詳細的調控機制及蛋白間的交互作用，目前仍未知。另外，本研究使用 promoter assay 的方式探討 *RSc0411* 與青枯病菌致病網中調控因子 *phcA* 間的關係，由實驗結果(圖十六)可知利用質體 pCZ962 當作載體將 *RSc0411* 的啟動子放入野生型菌株 Pss190 中可以強烈的啟動 LacZ 活性，但是將 *RSc0411* 的啟動子放入 *phcA* 突變株中，LacZ

活性明顯下降，因此推測 *RSc0411* 受到 PhcA 的調控。

10、青枯病菌其他突變株的型態與致病能力分析

為了確認是否因為 *RSc0411* 的 LPS 生合成降低而造成對番茄的致病力下降及喪失誘導菸草產生 HR 反應之能力，本研究分析青枯病菌 LPS 生合成基因 *rfaF* 突變株的各種致病能力及產生 HR 反應之能力。*rfaF* 突變株在含多種抗生素的 SM1 培養基與外加 SDS 的 CPG 培養基上皆有明顯的生長抑制，進一步利用 MIC 檢測 SM1 所含的抗生素 polymyxin B 及 tyrothricin，發現在營養豐富液體培養基中，野生型菌株與 *rfaF* 突變株在 tyrothricin 逆境下最小抑制濃度皆為 1.25 ppm。在 polymyxin B 逆境下，野生型菌株最小抑制濃度為 800 ppm，但 *rfaF* 突變株最小抑制濃度只有 12.5 ppm (表二)。由實驗結果(圖七、八)可知在生物膜形成及番茄根部的附著能力沒有顯著的差異，並且沒有喪失誘導菸草 W38 產生 HR 反應之能力，但在感染 *N. benthamiana* 72 小時後只呈現黃化病徵(圖九)。可見 *RSc0411* 並非因為 LPS 生合成降低而造成對番茄的致病力嚴重下降及喪失誘導菸草產生 HR 反應之能力。

此外，本研究為了測試 *RSc0411* 突變株是否因為細胞膜完整性有所缺陷而造成喪失誘導菸草產生 HR 反應之能力，首先將幾個可能膜完整性有所缺失的青枯病菌突變株 *RSc0411*、*RSc1206*、*rfaF*，利用其在營養貧瘠液體培養基中的 MIC 檢測 tyrothricin 之抗性，確定這些突變株的 MIC 皆小於野生型菌株為膜完整性有所缺失的菌株(圖十七)。再利用這些突變株測試菸草 HR 反應(圖十七)，發現除了 *RSc0411* 突變株外，其他突變株皆有 HR 反應，可知並非因為細胞膜完整性有所缺陷而造成喪失誘導菸草 HR 反應。

II、*murI* 基因之功能分析

1、*murI* 突變株之生理與生化特性分析

1-1. 生長曲線

murI 突變株和野生型菌株在營養貧瘠液體培養基 M9 中生長曲線並無明顯差異(圖十八)，且其在營養豐富或貧瘠固體培養基上生長速度也無明顯差異(圖十九)，並更進一步確認 *murI* 突變株和野生型菌株在植物體內增生能力無異(圖十八)。由此可以確認 *murI* 突變株並非是因為生長能力有問題，而造成其致病力降低。

1-2. 逆境反應分析

本研究利用幾種不同的逆境在 523 營養豐富液體培養基下進行測試，發現 *murI* 突變株在抗生素 polymyxin B、tyropricin、chloramphenicol、H₂O₂、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 逆境下，皆與野生型菌株無顯著差異(表五)。

1-3. API-Zym 酵素與細菌碳、氮源(Biolog™)的分析

本研究利用 API-Zym 商業套組進行分析青枯病菌 *murI* 突變株的各類水解酵素 (hydrolytic enzymes) 之活性，由實驗結果(表五)可知野生型菌株和 *murI* 突變株水解酵素的分泌並無顯著差異，*murI* 基因並無參與水解酵素的分泌，*murI* 突變株代謝相關酵素皆正常分泌。本研究利用商業套組 Biolog™ 分析青枯病菌 *murI* 突變株碳、氮源的利用是否與野生型菌株相同，發現其中幾個碳源與胺基酸的利用高於野生型菌株(如 m-inositol、aceric acid、succinic acid)(圖二十)。

1-4. 細胞型態的觀察

在大腸桿菌中，曾發現其 *murI* 條件突變株有細胞延長的現象(Baliko and Venetianer, 1993)，因此為分析青枯病菌 *murI* 突變株之細胞形態是否改變，本研究以穿透式電子顯微鏡觀察並比較其各種細胞形態。由實驗結果(圖二十一)顯示 *murI* 突變株細胞長度似乎較野生型菌株長，但此實驗目前只進行一次，仍需待未來進一步的量化統計。

2、*murI* 突變株致病力相關能力之分析

2-1. 青枯病菌早期致病因子之分析

為了瞭解青枯病菌 *murI* 突變株是否因其早期致病因子缺失而影響致病力，本研究測試其游動能力(*swimming* 和 *twitching*)、生物膜形成能力、番茄根部附著力及分泌破壞寄主植物細胞壁的酵素 (*Pme*、*Peh*、*Egl*)。由實驗結果(圖二十二)發現青枯病菌 *murI* 突變株 *swimming* 能力明顯下降，但兩者皆有 *twitching* 能力(圖二十三)，且生物膜形成能力、番茄根部附著力及分泌破壞寄主植物細胞壁的酵素 (*Pme*、*Peh*、*Egl*)皆無明顯差異(圖二十四、表五)

2-2. 菸草的反應測試

本論文利用菸草 Wisconsin 38 (W38)和 *N. benthamiana* 測試 *murI* 突變株的第三型分泌系統是否有所缺失及對菸草的致病反應，由實驗結果(圖二十五)可知，W38 在注入青枯病菌野生型菌株 Pss4 與其 *murI* 突變株 24 小時後皆無過敏性反應的產生，但野生型菌株 Pss190 與其 *murI* 突變株皆可誘導 W38 產生過敏性反應。*N. benthamiana* 在注入青枯病菌野生型菌株與 *murI* 突變株 24 小時後並無任何反應，但在 72 小時後發現葉片皆有組織壞死(*necrosis*)產生。

2-3. 番茄病原性測試

實驗室先前採用跳躍子(*Tn5*)策略製造數千株隨機青枯病菌突變株(Lin et al., 2008)。其中 *murI* 突變株在阿拉伯芥和番茄上致病力下降(附錄七)，本論文探討並確認 *murI* 突變株在番茄上的致病力，並更進一步檢測 *murI* 突變株在番茄植株不同部位的菌量，由實驗結果(圖二十六)可知野生型菌株在植株不同部位組織內(根的上部、根的下部、莖基部、莖部)的菌量皆到達 10^8 CFU/g 以上。但 *murI* 突變株卻只有在根的上、下部測到約 10^4 CFU/g 的菌量，植株的莖基部、莖部測到 $10^{0.5}$ CFU/g 的菌量，代表 *murI* 突變株在植株各部位中的感染與移動能力都顯著低於野生菌株。

3、驗證 *murI* 基因功能

3-1 構築 isogenic 突變株

為了驗證的確是由這個跳躍子插壞基因而造成上述許多致病能力的改變，利用自然轉型法(Bertolla et al., 1997)將跳躍子置換到另一台灣本土野生型青枯病菌 Pss4 和 Pss1308，分析是否有如同 Pss190 背景下的 *murI* 突變株所發現的 phenotype。由實驗結果(圖二十二)可知 Pss190 背景下的青枯病菌在 0.3% agar 上並無 *swimming motility* 的能力，但在 Pss4 和 Pss1308 背景下 *murI* 突變株 *swimming*

能力皆有下降趨勢。

3-2 互補株的構築與分析

為了更進一步確認 *murI* 缺失會造成青枯病菌致病力缺失。本論文利用低拷貝數之泛寄主質體 pUFR047 進行基因功能性互補試驗，將野生型菌株 Pss4 的 *murI* 互補到 Pss4 背景下 *murI* 突變株中，發現在此突變株中互補完整的 *murI* 基因無法恢復其致病力及游動力，往 *murI* 基因上游推 300 到 500 bp 則可以回復番茄的致病力及游動力，但互補 *fumA* (fumarate hydratase) 與 *murI* 基因卻無法回復這些缺失(圖二十六、二十七)。



第四章 討論

I、RSc0411 之功能探討

1. DUF1239 蛋白是否為生長必需蛋白

本論文實驗結果顯示 *RSc0411* 突變株在營養貧瘠液體和固體培養基上生長速度與野生型菌株 *Pss190* 無異(圖一、二)，但在營養豐富固體培養基上生長速度稍慢(圖二)。由於青枯病菌在植物寄主體內生活環境較似營養貧瘠培養基，且野生型菌株 *Pss190* 和 *RSc0411* 突變株在菸草 *N. benthamiana* 內的增生速度無異(圖三)，所以我們認為 *RSc0411* 突變株生長能力正常。在與 *RSc0411* 同屬於 DUF1239 蛋白家族的大腸桿菌 *LptC* 研究結果顯示，*LptC* 剔除株(deletion mutant)無法正常生長，只有利用 *LptC* 條件突變(conditional mutation)才可研究其功能，大腸桿菌 *LptC* 蛋白是生長必需蛋白(Sperandeo et al., 2006 and 2008)。推測可能因本實驗青枯病菌突變株是由跳躍子插入 *RSc0411* 基因後端部分(圖十一)，所以只破壞部分的 *RSc0411* 蛋白，此蛋白功能未被全部破壞，因此可以使 *RSc0411* 突變株正常生長。另外，也可能是因為青枯病菌 *RSc0411* 蛋白與大腸桿菌 *LptC* 功能有所不同，並非是生長必需蛋白，因此 *RSc0411* 突變株不會影響其正常生長。未來我們必須利用基因置換策略構築 *RSc0411* 剔除株(*RSc0411* deletion mutant)，才可確認 *RSc0411* 是否為青枯病菌生長必需蛋白。

2. RSc0411 參與 LPS 生合成

DUF1239 蛋白家族分布於微生物中，其中大部分存在於革蘭氏陰性菌中，目前研究只知大腸桿菌 *LptC* 為膜蛋白，位於內膜，是運送 LPS 從內膜到外膜的必需蛋白(Sperandeo et al., 2006 and 2008)。大腸桿菌 *LptC* 條件突變(conditional mutation)時，會造成細胞膜結構異常，因為無法將 LPS 運送至外膜，LPS 在內膜中不斷的被添加醣基，而造成分子量超大的平滑型脂多醣(S-LPS)累積在膜內(附錄五)(Sperandeo et al., 2008)。在本論文中，同屬於 DUF1239 蛋白家族的 *RSc0411* 突變株，在經過許多逆境測試實驗(包括檢測 LPS 及膜完整性)後，發現其膜完整性有所缺失(圖二、圖十七、表二)，並且其粗型脂多醣明顯減少(圖十三)，由這些

結果可推測 *RSc0411* 參與 LPS 生合成，但若要確認 *RSc0411* 是否為膜蛋白，未來需構築含有 *RSc0411* His-tag 的菌株，觀察其是否在細胞膜上。

但是，由於本實驗青枯病菌 *RSc0411* 突變株與大腸桿菌 *lptC* 突變株有許多表現型態差異，除上述 *RSc0411* 突變株可以正常生長外(圖二)，其細胞膜型態與野生型無明顯差異(圖四)，而且只有粗型脂多醣產量減少(圖十三)，這可能是因為本實驗青枯病菌突變株是由跳躍子插入 *RSc0411* 基因後端部分(圖十一)，所以只破壞部分的 *RSc0411* 蛋白，此蛋白功能未被全部破壞，導致無法觀察 *RSc0411* 突變株在脂多醣生合成與運送功能。目前初步利用定量 RT-PCR 去確認本實驗 *RSc0411* 突變株 *RSc0411* 基因前端的 RNA 表現量，發現 *RSc0411* 突變株仍然可以表現基因前端的 RNA(目前只進行一次實驗)，這與我們推測 *RSc0411* 突變株只破壞部分的功能相符。前人研究曾指出 S-LPS 與 R-LPS 都可以運送至外膜，維持外膜的穩定性(Osborn et al., 1980)，以抵抗不良逆境。因此推測 *RSc0411* 突變株雖然只有 R-LPS 產量減少，但可能造成膜完整性有所缺失，所以 *RSc0411* 突變株在測膜完整性逆境實驗生長明顯下降(圖二、表二)。為了瞭解 *RSc0411* 蛋白在青枯病菌 LPS 生合成與運送扮演的角色，未來應構築青枯病菌 *RSc0411* 剔除株(*RSc0411* deletion mutant)及各式在不同位置插入破壞之突變株，分析其 S-LPS 和 R-LPS 合成狀況，利用超薄細胞切片觀察細胞詳細構造變化。此外，在前人研究中曾指出若將大腸桿菌中運送 LPS 的蛋白 *LptA* 過量表現(overexpression)，用 TEM 即可明顯觀察到細胞膜向外突起呈小泡狀(Suits et al., 2008)；未來也可以構築 *RSc0411* 和其他 LPS 生合成與運輸相關基因的過量表現株(overexpression)觀察其細胞膜型態是否有差異，並探討其基因功能與其間之交互作用。

3. 青枯病菌脂多醣對致病力相關因子之影響

從本論文實驗結果得知，*RSc0411* 突變株的游動力(swimming)、生物膜形成能力、對番茄根部的附著力、LPS 生合成及第三型分泌系統皆有下降趨勢，這些致病能力都是青枯病菌成功感染寄主的重要因子，由前人研究已知如果其中一種致

病能力缺失則會造成青枯病菌致病力下降 (Tans-Kersten et al., 2001; Kang et al., 2002; Yao and Allen 2007)，且這些致病能力之間可能互相關聯影響。由前人在 *Rhizobium tropici* CIAT899 研究中，發現 LPS 生合成基因缺失會造成細菌游動力下降及對寄主的根附著力下降(Ormeno-Orrillo et al., 2008)。在 *Vibrio cholerae* 研究中，發現 LPS 生合成基因缺失會造成生物膜形成下降，無法對抗外在逆境(Nesper et al., 2001)。LPS 和第三型分泌系統的關聯性目前在動物病原細菌中已稍被研究。在 *Pseudomonas aeruginosa* 中若其無 LPS 之 O Antigens 會使第三型分泌系統表現增加 (Priebe et al., 2004; Augustin et al., 2007)，在 *Shigella* 研究中發現有醣基化的 LPS 才能促使第三型分泌系統的針管結構有效的入侵寄主細胞(West et al., 2005)，在 *Salmonella enterica* 研究中發現 *rfaH* (LPS 核心和 O Antigen 生合成基因)缺失會造成細菌 LPS 生合成降低，直接或間接影響其醣類代謝、趨化性和第三型分泌系統 (Nagy et al., 2006)，但其詳細機制目前仍未知。

青枯病菌 LPS 的研究甚少，大部分研究多探討其 LPS 結構與成分(Whatley et al., 1980; Varbanets et al., 1997 and 2003; Zdorovenko et al., 2008)，至於致病力相關的研究，目前只知道 LPS 生合成有關的基因缺失會降低對寄主植物的致病力(Hendrick and Sequeira, 1984; Titarenko et al., 1997)，至於是否與如何影響各個致病因子，目前仍未知。本研究藉由分析目前已知的青枯病菌 *rfaF* (LPS 核體生合成基因)突變株之各種致病因子，以探討青枯病菌 LPS 和其他致病因子間的關係。本研究發現 *rfaF* 突變株生物膜形成能力及番茄根部的附著力皆正常(圖七、圖八)，與之前其他細菌研究不同，青枯病菌 LPS 缺失不會影響生物膜形成及附著力。此外，*rfaF* 突變株誘導菸草 W38 產生 HR 反應之能力亦正常(圖九)。由前人研究可知青枯病菌第三型分泌系統可調控 70 多個毒力蛋白(Cunnac et al., 2004; Angot et al., 2006)，若其中幾個毒力蛋白缺失並不會影響其誘導菸草產生 HR 反應(Kanda et al., 2003)，除非上游調控基因缺失或辨認菸草 R 基因的 Avr 蛋白缺失才會喪失誘導菸草 HR 反應 (Aldon et al., 2000 ; Vasse et al., 2000; Poueymiro et al., 2009)。所以本研究只能宏觀

的測試青枯病菌是否可以誘導菸草產生 HR，倘若要了解第三型分泌系統的某些基因是否有受到影響而增減其表現，須更進一步以定量 RT-PCR 分析 *rfaF* 突變株中第三型分泌系統代表基因表現量。由實驗室前人研究中已知 *rfaF* 突變株萎凋指數比 *RSc0411* 突變株高(Lin et al., 2008)，可知在青枯病菌複雜的致病系統中，無法產生其中之一的致病因子 LPS，只會造成致病力下降而非完全喪失，但 *RSc0411* 突變株幾乎已無致病力，可見青枯病菌 *RSc0411* 突變株並非全因 LPS 合成缺失，而造成無致病力，*RSc0411* 應該參與其他更重要調控青枯病菌致病的路徑。

4. *RSc0411* 參與青枯病菌第三型分泌系統之調控

青枯病菌可以藉由第三型分泌系統攻擊它們的寄主，此系統是決定寄主初期病原性的關鍵，並可誘導抗性植物形成過敏性反應。本研究發現 *RSc0411* 突變株失去誘導菸草 W38 形成 HR 及造成番茄致病力嚴重缺失(圖九、十)，而且並非因為細胞外膜結構有缺失的青枯病菌突變株仍可在煙草上引起正常 HR(圖十七)。由目前的研究可知青枯病菌中已有 70 個 T3SEs 被報導，若單獨缺少其中一個 T3SE (如:PopA)並不會影響植物過敏性反應的產生及對番茄致病力嚴重缺失(Kanda et al., 2003)，除非缺少可專一性辨認菸草 W38 抗性蛋白的 T3SE，才會造成過敏性反應的喪失(Poueymiro et al., 2009)，但亦不會造成番茄致病力嚴重缺失；唯有上游調控者 HrpB、HrpG 突變缺失才會造成喪失過敏性反應的產生及對番茄致病力嚴重缺失，所以 *RSc0411* 應該影響在第三型分泌系統中的上游，這與本研究推測 *RSc0411* 參與決定寄主初期病原性的關鍵第三型分泌系統，並且位於主要調控者 *hrpG* 的下游，直接或間接調控 *hrpB* 而影響青枯病菌致病力的結果相符，至於詳細的調控機制及蛋白間的交互作用，目前仍未知。此外，本研究發現 *RSc0411* 啟動子在 *phcA* 突變株中表現量下降，由此可知 *RSc0411* 會被 PhcA 調控(圖十六)，但由目前已知的青枯病菌致病網(附錄六)可知 PhcA 會抑制第三型分泌系統上游的 PrhI，進而影響此系統表現量下降，因此推測位於 HrpG 下游的 *RSc0411* 之啟動子在 *phcA* 突變株中應表現量上升，這與本研究的實驗結果不合，推測可能因為 *RSc0411* 除了參

與第三型分泌系統外，也參與了 LPS 的生合成，PhcA 可能也調控 LPS 生合成，因此造成此結果。未來將以 promoter assay 的方法進行分析，以更進一步瞭解 RSc0411 在致病網中所扮演的角色與參與的路徑。

5. *Ralstonia* 親緣相近之 DUF1239 家族新穎功能探討

青枯病菌 *RSc0411* 基因產物隸屬於功能未知的 DUF1239 家族，且獨特並廣泛分布於細菌中，為分析 DUF1239 蛋白家族之可能功能，本論文利用比較基因體學及功能性研究，針對 DUF1239 家族在青枯病菌及其他具代表性且重要的植物病原與環境細菌中進行功能性研究，分析源自其他生物之 DUF1239 之功能是否與青枯病菌 *RSc0411* 具相同功能。藉由比較 DUF1239 蛋白附近基因群的胺基酸序列相似度結果，可知在 DUF1239 蛋白附近基因群大都是與 LPS 生合成相關的基因，KdsD 和 KdsC 是生合成 3-deoxy-D-manno-octulosonate (組成 LPS 的重要成份) 的基因，LptA 和 LptB 是運送 LPS 到外膜的必需蛋白，其中只有 LptB 具有高度序列相似性(圖十四)。比較具代表性的革蘭氏陰性菌運送 LPS 到外膜的蛋白群序列相似性，發現只有 LptB、MsbA 有高度序列相似性(表三)，LptB 與 MsbA 都是 ABC protein，其中 LptB 為組成 ABC transporter 中的核心蛋白。除了 LptB 與 MsbA 外，其他 DUF1239 附近基因群及協助運送 LPS 蛋白群只與 *Ralstonia* 親緣近之細菌屬(*Rme*、*Reu*、*Ct*)有高度相似度，與其他 *Ralstonia* 親緣關係較遠的細菌(*Xcv*、*Ecc*、*E. coli*)相似度則低。推測這些協助運送 LPS 的蛋白依親緣關係演化出其獨特性。

本論文將各細菌 DUF1239 基因互補株進行膜逆境、菸草 HR 反應、生物膜形成、番茄根部附著力、R-LPS 生合成測試後，可知與 *Ralstonia* 屬親緣關係較遠的細菌無法進行功能互補，親緣關係較近的 *Ralstonia* 屬則可進行功能互補，這些結果可以以幾個面向來進行探討。首先，由於大腸桿菌 *lptC* 相關操縱子與青枯病菌 *RSc0411* 相關操縱子之結構不盡相同(圖十四)，若進行互補實驗的低拷貝數之泛寄主質體 pUFR047 並無適當之啟動子，可能需要同時互補大腸桿菌 *kdsC* 和 *lptC* 才能成功互補青枯病菌 *RSc0411* 突變株之功能；而 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 和 *E.*

carotovora subsp. *carotovora* 中的 DUF1239 操縱子結構目前仍未知，所以單獨互補其 DUF1239 基因不一定可以功能互補。故未來應確認這些互補株是否確實有 RNA 及蛋白質表現，才可確定這些互補株真的為非功能互補株。倘若在互補菌株中之外源基因確實可有效表現，則可由此推測 *Rastonia* 屬及與其親緣關係相近屬的 DUF1239 家族可能已經演化出特別的功能，參與細菌第三型分泌系統之調控。其次，比較青枯病菌 LPS 生合成每個步驟所需的代表蛋白與其他細菌同源基因之序列相似度(表三)發現，lipid A 生合成蛋白相似度極高，核心多醣合成蛋白相似度較低，只有 RfaF、RSc2084 與 *Rastonia* 親緣近之細菌屬基因相似度較高，而 O-antigen 連接到核心多醣所需的蛋白 RSc2204 相似度極低。比較青枯病菌與大腸桿菌 LPS 的結構與成分發現，其在核心多醣組成結構中就有明顯不同(Whatley et al., 1980; Varbanets et al., 2003; Fridrich and Whitfield, 2005; Zdrovenko et al., 2008)，可見不同細菌之 R-LPS 組成不盡相同，推測大腸桿菌和其他植物病原菌 DUF1239 蛋白無法互補青枯病菌 *RSc0411* 突變株 R-LPS 的生合成，可能因其無法辨認青枯病菌 R-LPS 生合成的其他蛋白，無法與其進行交互作用，而導致其無法參與青枯病菌 R-LPS 生合成。

本研究成功功能互補青枯病菌 *RSc0411* 突變株的 DUF1239 基因分別來自於抗重金屬細菌 *R. metallidurans* CH34、可以產生生物塑膠的細菌 *R. eutropha* H16 及瘤固氮菌 *C. taiwanensis*。這三個細菌雖並非病原菌，但都為土棲菌，細菌外膜的 LPS 可以有效地保護其免受土壤中毒性物的傷害，因此推測與 *Rastonia* 親緣相近之土棲菌的 DUF1239 蛋白可能已演化出特別且具高度新穎性的功能，參與 R-LPS 的生合成以抵抗土中逆境。此外，雖然從本論文實驗結果發現與 *Rastonia* 屬親緣關係較遠細菌的 DUF1239 基因無法功能互補，為了確認植物病原菌 *X. campestris* pv. *vesicatoria* 和 *E. carotovora* subsp. *carotovora* 中的 DUF1239 基因功能是否和 LPS 生合成、病原性相關，未來應同時在這些細菌(*Rastonia* 屬與其他重要植物病原菌)中採取基因置換策略，分別構築其 DUF1239 基因之缺失菌株，並分析其各種 *in vitro*

與 *in planta* 特性，包括 LPS 生合成、病原性或抗污染能力，以確認在這些細菌中 DUF1239 基因之功能。

6. 青枯病菌第三型分泌系統與其它致病因子的關係

由前人研究可知 HrpG 也可藉由與 HrpB 無關之調控路徑(HrpB-independent HrpG regulon)調控其他重要的致病因子，若 HrpG 突變會造成分解植物細胞壁酵素 Egl、Peh 分泌減少(Valls et al., 2006)。但 *RSc0411* 突變株的分解植物細胞壁酵素 Egl、Peh 分泌並無減少情況(表二)，且在此突變株中 *hrpB* 基因表現明顯下降，因此推測 *RSc0411* 應屬於 HrpB-dependent 的調控路徑。

從前人的研究中可知在 *Erwinia amylovora*、*P. aeruginosa* 中第三型分泌系統與鞭毛游動的系統是負相關調節，若 *E. amylovora* 第三型分泌系統調控者 HrpL 缺失則其 swimming 游動力增加(Cesbron et al., 2006)，若 *P. aeruginosa* 中第三型分泌系統調控者 ExsA 過量表現，會造成鞭毛基因表現下降及游動力明顯降低(Soscia et al., 2007)。本研究卻發現在 Pss4 背景下 *RSc0411* 突變株游動力有下降的現象(圖五)，這與前人研究結果不同，也許因為 *E. amylovora*、*P. aeruginosa* 屬於第一群第三型分泌系統(需與 σ^{54} 結合)，而青枯病菌是屬於第二群第三型分泌系統(不需與 σ^{54} 結合)，其機制有所不同，而有不同的結果。或者，其游動力下降是因為 LPS 生合成缺失所造成的現象(Ormeno-Orrillo et al., 2008)，與第三型分泌系統無關。

7. 青枯病菌與菸草之交互作用

植物病原菌 T3SEs 為與植物 R 基因辨認的 Avr 蛋白，可誘導抗性植物產生專一的過敏性反應，目前已知青枯病菌的 popP1 可辨認矮牽牛(Lavie et al., 2002)，popP2 可辨認阿拉伯芥(Deslandes et al., 2003)，而 popP1 和 avrA 可辨認不同種的菸草(Poueymiro et al., 2009)。由本研究可知野生型菌株 Pss190 可以在感染菸草 W38 24 小時後產生過敏性反應，但野生型菌株 Pss4 卻無法誘導其產生過敏性反應(圖九)，推測 Pss4 中可能缺少一個可以和菸草 W38 辨認的 T3SE 而造成此現象。由於目前研究已知青枯病菌 GMI1000 中 AvrA 為主要辨認菸草 *N. tabacum* 和 *N.*

benthamiana 之 Avr 蛋白，而 PopP1 為主要辨認菸草 *N. glutinosa* 之 Avr 蛋白，其 *avrA* 突變株會造成降低誘導 *N. tabacum* 的過敏性反應，及在 72 小時後降低在 *N. benthamiana* 中產生之壞死現象，而 *popP1* 突變株在菸草 *N. tabacum* 和 *N. benthamiana* 中不會有任何影響 (Poueymiro et al., 2009)。但由本實驗可知 Pss4 僅在菸草 *N. tabacum* 中有過敏性反應的延遲現象(需待 2-3 天才會有過敏性反應)，在 *N. benthamiana* 中仍產生正常之壞死現象，可知其並非 PopP1 或 AvrA 有所缺失，應該另有其他可與菸草 *N. tabacum* 辨認的 T3SE 有所缺失，但目前仍未知其確切身分。

本研究將青枯病菌注入於抗病植物 *N. tabacum* W38 和感病植物 *N. benthamiana* 之葉片中，觀察菸草與青枯病菌之交互作用，病菌在抗病植物 *N. tabacum* W38 中會誘發過敏性反應，在感病植物 *N. benthamiana* 中會造成嚴重壞死或輕微黃化病徵。本研究發現在感病植物 *N. benthamiana* 中的反應與前人研究將病菌直接注入番茄莖部造成的致病力結果相似(附錄七)，野生型菌株 Pss190 產生在 *N. benthamiana* 中產生嚴重壞死，在番茄中萎凋率高達 100%；*RSc0411* 突變株在 *N. benthamiana* 中產生輕微黃化病徵，在番茄中不會造成萎凋；*rfaF* 突變株在 *N. benthamiana* 中產生輕微黃化病徵，在番茄中萎凋率只有 59%。由 *rfaF* 突變株結果可知青枯病菌 LPS 生合成缺失對其病原性有一定程度的影響；而 *RSc0411* 突變株除了 LPS 生合成缺失外，亦影響第三型分泌系統，所以造成更嚴重的致病力缺失，無法使番茄產生萎凋病徵。

在 Pss4 背景下的 *RSc0411* 突變株在 *N. benthamiana* 上產生與野生型菌株相同之壞死，並沒有在如同 Pss190 背景下的突變株產生病徵較輕的黃化反應(圖九)。事實上 Pss4 背景下的 *RSc0411* 突變株有許多致病因子下降趨勢皆不如 Pss190 背景下的突變株(圖七、八)，推測可能因在 Pss4 中這些致病因子並無嚴重缺失，而整體性地造成其對菸草的病原性無明顯的影響。此外，由於 Pss4 背景下的 *RSc0411* 突變株尚未進行番茄病原性測試及第三型分泌系統基因表現分析，所以無法確定

破壞 *RSc0411* 第三型分泌系統之影響程度。雖然 Pss4 和 Pss190 都是台灣本土番茄中所分離出的菌種，但其分別屬於 biovar 3 和 biovar 4，且 Pss190 為高毒力菌株，而 Pss4 為中毒力菌株，可能因這兩個菌株 genetic background 不同，所以導致結果不盡相同。未來將構築同為 Pss190 背景下的 *RSc0411* 突變株(插入位置不同)，以避免不同 genetic background 的野生型菌株間之差異，而有不同的結果。

II、*murI* 基因之功能探討

1. MurI 蛋白是否為生長必需蛋白

MurI 為催化 D-glutamate 產生的重要酵素。在大腸桿菌中若此蛋白缺失則會造成細菌無法生長而致死(Baliko and Venetianer, 1993)；在 *B. subtilis* 中有兩個基因 *racE*、*yrcC* 轉譯 glutamase racemase，在營養豐富培養基中 *racE* 為必需表現蛋白，但在營養貧瘠培養基中 *racE* 為非必需表現蛋白，而 *yrcC* 只在營養貧瘠培養基中表現，*racE* 缺失株無法在營養豐富培養基中正常生長，至於基因必須表現是否和 D-glutamase 生合成有關，目前仍未知 (Kimura et al., 2004)。本論文實驗結果卻顯示 *murI* 突變株在營養貧瘠液體和固體培養基上生長速度與野生型菌株無異(圖十八、十九)，且野生型菌株和 *murI* 突變株在菸草 *N. benthamiana* 內的增生速度無異(圖十八)，所以我們認為 *murI* 突變株生長能力正常；造成這些異於前人研究發現的結果之原因可能有三種。首先，在青枯病菌中可能有 D-amino acid transaminase 產生 D-glutamate 使細菌正常細胞分裂、形成肽聚醣細胞壁，而可以正常生長。前人發現若將 D-amino acid transaminase 的基因互補到大腸桿菌 D-glutamate 營養缺陷株 WM335 (*murI* 基因缺失株)中，可以產生代償作用(Compensation)產生低量的 D-glutamate 而維持細胞生存，可見在革蘭氏陰性菌中只需少量的 D-glutamate 即可使細菌存活(Liu et al., 1998)。但是目前的研究文獻顯示，由於革蘭氏陽性菌細胞壁有較厚的肽聚醣層，需要較多的 D-glutamate，因此大多有 D-amino acid transaminase，革蘭氏陰性菌目前尚未發現有 D-amino acid transaminase (Lundqvist et

al., 2007), 所以屬於革蘭氏陰性菌的青枯病菌應該沒有 D-amino acid transaminase , 因此 *murI* 突變株應不是利用此酵素產生 D-glutamate 而生存。

其次，細菌中除了有兩個可以產生 D-glutamate 的路徑外，還可利用消耗 ATP 將外來的 L-glutamate 和 D-glutamate 運送至體內(Jacobs et al., 1995), 也許青枯病菌突變株是利用此路徑來補充體內 D-glutamate 的不足，未來可以將青枯病菌 *murI* 突變株培養在以 L-glutamate 為唯一碳源的培養基中，測試其生長情況是否與野生型菌株一致，以確認 *murI* 突變株是否會利用外來的 D-glutamate 來補充體內 D-glutamate 的不足。

此外，推測可能因為本研究的突變株是插在 *murI* 中間，並未完全破壞此蛋白功能，尤其並未破壞其 N 端，由前人研究可知革蘭氏陰性菌大腸桿菌中 MurI 的 N 端有活化子 UDP-MurNAc-L-Ala 的辨認區(Ho et al., 1995), 如果青枯病菌也需要活化子 UDP-MurNAc-L-Ala 的活化才有酵素活性的話，此區域的完整性是非常性要的。並且在大腸桿菌中，發現只要有 MurI 的 N 端酵素就有 glutamate racemase 功能，催化 D-glutamate 的產生，雖然產量只有 MurI 全長酵素的 20%，但是由於革蘭氏陰性細菌只須少量的 D-glutamate 即可生存，因此不影響其生長(Ho et al., 1995; Liu et al., 1998)。所以本研究的突變株可能仍然有部分 glutamate racemase 功能，製造少量的 D-glutamate 而維持生存。未來可以利用基因置換策略構築 *murI* 剔除株 (*murI* deletion mutant)，確認 MurI 是否為青枯病菌生長必需蛋白。

2. 青枯病菌MurI在細胞型態與生理特性之功能

在大腸桿菌中若 *murI* 條件突變，可發現其細胞分裂受到影響，而有細胞成絲狀延長的現象(Baliko and Venetianer, 1993)。本論文雖然尚未進行細菌細胞型態之量化分析，利用穿透式電子顯微鏡觀察到 *murI* 突變株似乎較野生型長(圖二十一)，推測本實驗 *murI* 突變株的 glutamate racemase 催化產生 D-glutamate 的能力應該有受某種程度的到影響，至於其 DNA gyrase 抑制子能力是否有受影響目前仍未知，未來可以測試 *murI* 突變株的 DNA gyrase 抑制子能力是否有受影響。

在逆境 EDTA(可抓住金屬離子)測試中發現，野生型菌株與 *murI* 突變株並無差異，可見青枯病菌 MurI 蛋白不須金屬離子當作輔酶幫助其催化活性，就如同其他細菌中的 MurI 為不須輔酶(cofactor-independent)的 glutamate racemase (Mobitz and Bruce, 2004)。

3. 青枯病菌 MurI 影響致病力分析

由實驗結果圖二十二、二十七可知青枯病菌 *murI* 突變株的游動力(swimming motility)下降。游動力是青枯病菌早期入侵寄主的重要致病因子，若青枯病菌無法順利游到寄主根部，則無法順利造成入侵感染。前人研究可知無法產生鞭毛的青枯病菌突變株(*fliC*)澆灌番茄會造成致病力下降，但若直接用莖部穿刺感染番茄，則可恢復其致病力(Tans-Kersten et al., 2001)。本研究發現青枯病菌 *murI* 突變株澆灌番茄植株會造成致病力下降，但直接注入菸草 *N. benthamiana* 會產生嚴重壞死之病徵，且實驗室前人利用莖部穿刺此突變株感染番茄，發現其恢復致病力而造成番茄的萎凋(附錄七)。由此推測此突變株應該因早期致病因子(游動力)的缺失而造成致病力下降，直接將病菌注入寄主植株則可恢復其致病力。在 *Sinorhizobium meliloti* 中發現鞭毛結構 rotor-stator 間有幾個重要且保留性高的 glutamate 胺基酸，可以影響鞭毛的游動速度(Attmannspacher et al., 2005)。在 *Pseudomonas aeruginosa* 中若以 L-glutamate 為單一氮源，會促使其 swarming motility(藉由鞭毛和纖毛在半固體培養基上游動)增加(Kohler et al., 2000)。可見細菌體內的 glutamate 與其游動力相關，但其中詳細機制目前仍未知，未來應該以定量 RT-PCR 來檢測 *murI* 突變株中的鞭毛相關基因是否表現正常。

趨化性(chemotaxis)對於生活在土中的青枯病菌是否能正確感應寄主植物根部的位址進而順利的游到此部位是非常重要的。在 *Rhodobacter sphaeroides* 中發現細菌需要運送 glutamate 到細胞中及在體內有適當的 glutamate 代謝才能表現完整的趨化性(Jacobs et al., 1995)，因此未來應該要測試青枯病菌 *murI* 突變株對植物寄主根部的趨化性是否正常。

4. *murI* 為青枯病菌之關鍵致病基因

實驗室前人曾以完整的MurI蛋白(無基因前端啟動子)互補至Pss190背景下*murI*突變株，發現可以稍稍恢復其對阿拉伯芥的致病力(附錄八)，但致病力恢復效果不佳，並且無法恢復其對番茄的致病力(尚未發表)，推測可能因需要*murI*啟動子才能成功互補其對番茄的致病力。因此本研究在進行互補實驗時，構築了不同大小的互補株(附錄九)。前人曾對大腸桿菌 glutamate racemase突變株 JM109，進行互補大腸桿菌的*murI*啟動子(*murI*前推上游500鹼基對)，發現無法成功互補其glutamate racemase 表現，但若在其*murI*前添加人工的核糖體結合區(ribosome-binding region)即可成功互補glutamate racemase表現(Liu et al., 1998)，推測可能大腸桿菌中*murI*前端並無*murI*啟動子。本研究卻發現互補青枯病菌*murI*前推上游300到500鹼基對的互補株可以恢復其對番茄的致病力(圖二十六)，推測可能此段區域包含了青枯病菌*murI*啟動子，因此，青枯病菌和大腸桿菌的操縱子結構可能不同。未來可以研究青枯病菌*murI*操縱子結構，並與其他細菌比較異同。但本研究互補株的glutamate racemase活性是否完全恢復，目前仍未知，有待進一步的確認。另外，本研究發現互補青枯病菌*murI*和其前端基因*fumA*造成無法恢復番茄致病力(圖二十六)，前端基因*fumA*的產物為fumarate hydratase，fumarate hydratase主要是參與檸檬酸循環(TCA cycle)中將malate催化成fumarate的酵素(Woods et al., 1988)，在fumarate形成後再經一連串的酵素催化可以代謝成2-oxoglutarate，而2-oxoglutarate可經由glutamate合成酶催化成L-glutamate(附錄十一)，過量的L-glutamate產生可能會造成細菌glutamate體內代謝失衡，而使D-glutamate產量減少。由於目前仍無相關研究文獻，因此目前只能推測可能因為前端基因*fumA*的產物fumarate hydratase過量表現而抑制glutamate racemase，而造成無法恢復其對番茄致病力。

結語：

由 *R. solanacearum* 所引起的青枯病係一全球重要之土壤傳播性維管束病害，目前我們對於這個極為複雜且破壞力極強的病菌的了解仍是十分有限，且無有效的防治方法。本論文藉由深入研究青枯病菌各個致病因子，首次發現植物病原菌中 LPS 生合成基因可同時參與第三型分泌系統的調控，並確認新穎蛋白 RSc0411 與 RSc1956 確實是青枯病菌之關鍵致病基因。希冀藉由全面性地了解青枯病菌的致病機制，以期許能夠進而建立新的、具有潛力的策略，有效地應用於重要作物之防治病害工作上。



参考文献

- Aldon, D., Brito, B., Boucher, C., and Genin, S.** (2000). A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. *EMBO J* **19**, 2304-2314.
- Angot, A., Peeters, N., Lechner, E., Vailleau, F., Baud, C., Gentzittel, L., Sartorel, E., Genschik, P., Boucher, C., and Genin, S.** (2006). *Ralstonia solanacearum* requires F-box-like domain-containing type III effectors to promote disease on several host plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 14620-14625.
- Ashiuchi, M., Kuwana, E., Yamamoto, T., Komatsu, K., Soda, K., and Misono, H.** (2002). Glutamate racemase is an endogenous DNA gyrase inhibitor. *J Biol Chem* **277**, 39070-39073.
- Attmannspacher, U., Scharf, B., and Schmitt, R.** (2005). Control of speed modulation (chemokinesis) in the unidirectional rotary motor of *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Microbiol* **56**, 708-718.
- Araud-Razou, I., Vasse, J., Montrozier, H., Etchebar, C., and Trigalet, A.** (1998). Detection and visualization of the major acidic exopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* and its role in tomato root infection and vascular colonization. *Eur J Plant Pathol.* **104**, 795-809.
- Augustin, D.K., Song, Y., Baek, M.S., Sawa, Y., Singh, G., Taylor, B., Rubio-Mills, A., Flanagan, J.L., Wiener-Kronish, J.P., and Lynch, S.V.** (2007). Presence or absence of lipopolysaccharide O antigens affects type III secretion by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**, 2203-2209.
- Baker, C.J., Neilson, M.J., Sequeira, L., and Keegstra, K.G.** (1984). Chemical Characterization of the lipopolysaccharide of *Pseudomonas solanacearum*. *Appl Environ Microbiol* **47**, 1096-1100.
- Baliko, G., and Venetianer, P.** (1993). An *Escherichia coli* gene in search of a function: phenotypic effects of the gene recently identified as *murI*. *J Bacteriol* **175**, 6571-6577.
- Bertolla, F., Van Gijsegem, F., Nesme, X., and Simonet, P.** (1997). Conditions for natural transformation of *Ralstonia solanacearum*. *Appl Environ Microbiol* **63**, 4965-4968.
- Bhatt, G., and Denny, T.P.** (2004). *Ralstonia solanacearum* iron scavenging by the siderophore staphyloferrin B is controlled by PhcA, the global virulence regulator. *J Bacteriol* **186**, 7896-7904.
- Bos, M.P., Robert, V., and Tommassen, J.** (2007). Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu Rev Microbiol* **61**, 191-214.
- Boucher CA, Barberis PA, Trigalet AP, Demery DA** (1985) Transposon mutagenesis of *Pseudomonas solanacearum*: isolation of Tn5-induced avirulent mutants. *J.*

Gen. Microbiol. **131**: 2449-2457

- Branch, A., Starkey, D.H., and Power, E.E.** (1965). Diversifications in the tube dilution test for antibiotic sensitivity of microorganisms. *Appl Microbiol* **13**, 469-472.
- Buddenhagen, I., and Kelman, A.** (1964). Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2**, 203-230.
- Buttner, D., and Bonas, U.** (2006). Who comes first? How plant pathogenic bacteria orchestrate type III secretion. *Curr Opin Microbiol* **9**, 193-200.
- Candela, T., and Fouet, A.** (2006). Poly-gamma-glutamate in bacteria. *Mol Microbiol* **60**, 1091-1098.
- Cesbron, S., Paulin, J.P., Tharaud, M., Barny, M.A., and Brisset, M.N.** (2006). The alternative sigma factor HrpL negatively modulates the flagellar system in the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora* under *hrp*-inducing conditions. *FEMS Microbiol Lett* **257**, 221-227.
- Chagneau, C., and Saier, M.H., Jr.** (2004). Biofilm-defective mutants of *Bacillus subtilis*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **8**, 177-188.
- Chellemi, D.O., Dankers, H.A., Olson, S.M., Hodge, N.C., and Scott, J.W.** (1994). Evaluating bacterial wilt-resistant tomato genotypes using a regional approach. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **119**, 325-329.
- Cohn, J.R., and Martin, G.B.** (2005). *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* type III effectors AvrPto and AvrPtoB promote ethylene-dependent cell death in tomato. *Plant J* **44**, 139-154.
- Cunnac, S., Boucher, C., and Genin, S.** (2004). Characterization of the *cis*-Acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* **186**, 2309-2318.
- De Feyter, R., Yang, Y., and Gabriel, D.W.** (1993). Gene-for-genes interactions between cotton R genes and *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* avr genes. *Mol Plant Microbe Interact* **6**, 225-237.
- Denny, T.P.** (2006). Plant pathogenic *Ralstonia* species. In: *Plant-Associated Bacteria*. Gnanamanickam, S.S. ed. Springer, Dordrecht. pp. 573-644.
- Denny TP, Hayward AC** (2001) *Ralstonia solanacearum*. In NW Schaad, JB Jones, W Chun, eds, *Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria*. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, U.S.A.
- Deslandes, L., Olivier, J., Peeters, N., Feng, D.X., Khounlotham, M., Boucher, C., Somssich, I., Genin, S., and Marco, Y.** (2003). Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III

- effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8024-8029.
- Doublet, P., van Heijenoort, J., and Mengin-Lecreux, D.** (1994). The glutamate racemase activity from *Escherichia coli* is regulated by peptidoglycan precursor UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine. *Biochemistry* **33**, 5285-5290.
- Dow, M., Newman, M.A., and von Roepenack, E.** (2000). The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Phytopathol* **38**, 241-261.
- Flavier, A.B., Clough, S.J., Schell, M.A., and Denny, T.P.** (1997). Identification of 3-hydroxypalmitic acid methyl ester as a novel autoregulator controlling virulence in *Ralstonia solanacearum*. *Mol Microbiol* **26**, 251-259.
- Fotheringham, I.G., Bledig, S.A., and Taylor, P.P.** (1998). Characterization of the genes encoding D-amino acid transaminase and glutamate racemase, two D-glutamate biosynthetic enzymes of *Bacillus sphaericus* ATCC 10208. *J Bacteriol* **180**, 4319-4323.
- Firdich, E., and Whitfield, C.** (2005). Lipopolysaccharide inner core oligosaccharide structure and outer membrane stability in human pathogens belonging to the *Enterobacteriaceae*. *J Endotoxin Res* **11**, 133-144.
- Gabriel, D.W., Allen, C., Schell, M., Denny, T.P., Greenberg, J.T., Duan, Y.P., Flores-Cruz, Z., Huang, Q., Clifford, J.M., Presting, G., Gonzalez, E.T., Reddy, J., Elphinstone, J., Swanson, J., Yao, J., Mulholland, V., Liu, L., Farmerie, W., Patnaikuni, M., Balogh, B., Norman, D., Alvarez, A., Castillo, J.A., Jones, J., Saddler, G., Walunas, T., Zhukov, A., and Mikhailova, N.** (2006). Identification of open reading frames unique to a select agent: *Ralstonia solanacearum* race 3 biovar 2. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 69-79.
- Garg, R.P., Huang, J., Yindeeoungyeon, W., Denny, T.P., and Schell, M.A.** (2000). Multicomponent transcriptional regulation at the complex promoter of the exopolysaccharide I biosynthetic operon of *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol* **182**, 6659-6666.
- Genin, S., and Boucher, C.** (2004). Lessons learned from the genome analysis of *Ralstonia solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* **42**, 107-134.
- Genin, S., Brito, B., Denny, T.P., and Boucher, C.** (2005). Control of the *Ralstonia solanacearum* Type III secretion system (Hrp) genes by the global virulence regulator PhcA. *FEBS Lett* **579**, 2077-2081.
- Gonzalez, E.T., and Allen, C.** (2003). Characterization of a *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galacturonic acid. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 536-544.
- Graham, T.L., Sequeira, L., and Huang, T.S.** (1977). Bacterial lipopolysaccharides as inducers of disease resistance in tobacco. *Appl Environ Microbiol* **34**, 424-432.

- Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.** (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**, 1773-1791.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hanson, P.M., Licardo, O., Hanudin, Wang, J.F., and Chen, J.** (1998). Diallel analysis of bacterial wilt resistance in tomato derived from different sources. *Plant Dis.* **82**, 74-78.
- Hauck, P., Thilmoney, R., and He, S.Y.** (2003). A *Pseudomonas syringae* type III effector suppresses cell wall-based extracellular defense in susceptible Arabidopsis plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8577-8582.
- Hayward, A.C.** (1991). Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Annu Rev Phytopathol* **29**, 65-87.
- He, S.Y., Nomura, K., and Whittam, T.S.** (2004). Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 181-206.
- Hendrick, C.A., and Sequeira, L.** (1984). Lipopolysaccharide-defective mutants of the wilt pathogen *Pseudomonas solanacearum*. *Appl Environ Microbiol* **48**, 94-101.
- Hikichi1, Y., Yoshimochi1, T., Tsujimoto1, S., Shinohara1, R., Nakaho, K., Kanda1, A., Kiba1, A., and Ohnishi, K.** (2007). Global regulation of pathogenicity mechanism of *Ralstonia solanacearum*. *Plant Biotechnology* **24**, 149-154.
- Ho, H.T., Falk, P.J., Ervin, K.M., Krishnan, B.S., Discotto, L.F., Dougherty, T.J., and Pucci, M.J.** (1995). UDP-N-acetylmuramyl-L-alanine functions as an activator in the regulation of the *Escherichia coli* glutamate racemase activity. *Biochemistry* **34**, 2464-2470.
- Hueck, C.J.** (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 379-433.
- Jacobs, M.H., van der Heide, T., Tolner, B., Driessen, A.J., and Konings, W.N.** (1995). Expression of the *gltP* gene of *Escherichia coli* in a glutamate transport-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides* restores chemotaxis to glutamate. *Mol Microbiol* **18**, 641-647.
- Jaunet, T.X., and Wang, J.F.** (1999). Variation in genotype and aggressiveness of *Ralstonia solanacearum* race 1 isolated from tomato in Taiwan. *Phytopathology* **89**, 320-327.
- Jelenska, J., Yao, N., Vinatzer, B.A., Wright, C.M., Brodsky, J.L., and Greenberg, J.T.** (2007). A J-domain virulence effector of *Pseudomonas syringae* remodels host chloroplasts and suppresses defenses. *Curr Biol* **17**, 499-508.
- Jofre, E., Lagares, A., and Mori, G.** (2004). Disruption of dTDP-rhamnose biosynthesis modifies lipopolysaccharide core, exopolysaccharide production,

- and root colonization in *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiol Lett **231**, 267-275.
- Kado, C.I., and Heskett, M.G.** (1970). Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. Phytopathology **60**, 969-976.
- Kanda, A., Yasukohchi, M., Ohnishi, K., Kiba, A., Okuno, T., and Hikichi, Y.** (2003). Ectopic expression of *Ralstonia solanacearum* effector protein PopA early in invasion results in loss of virulence. Mol Plant Microbe Interact **16**, 447-455.
- Kang, Y., Liu, H., Genin, S., Schell, M.A., and Denny, T.P.** (2002). *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. Mol Microbiol **46**, 427-437.
- Kao, C.C., and Sequeira, L.** (1991). A gene cluster required for coordinated biosynthesis of lipopolysaccharide and extracellular polysaccharide also affects virulence of *Pseudomonas solanacearum*. J Bacteriol **173**, 7841-7847.
- Kim, S. H., Olson, T. N., Schaad, N. W., and Moorman, G. W.** (2003). *Ralstonia solanacearum* race 3, biovar 2, the causal agent of brown rot of potato, identified in geraniums in Pennsylvania, Delaware, and Connecticut. Plant Dis. **87**:450.
- Kimura, K., Tran, L.S., and Itoh, Y.** (2004). Roles and regulation of the glutamate racemase isogenes, *racE* and *yrcC*, in *Bacillus subtilis*. Microbiology **150**, 2911-2920.
- Kohler, T., Curty, L.K., Barja, F., van Delden, C., and Pechere, J.C.** (2000). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. J Bacteriol **182**, 5990-5996.
- Lavie, M., Shillington, E., Eguiluz, C., Grimsley, N., and Boucher, C.** (2002). PopP1, a new member of the YopJ/AvrRxv family of type III effector proteins, acts as a host-specificity factor and modulates aggressiveness of *Ralstonia solanacearum*. Mol Plant Microbe Interact **15**, 1058-1068.
- Lin, Y.M., Chou, I.C., Wang, J.F., Ho, F.I., Chu, Y.J., Huang, P.C., Lu, D.K., Shen, H.L., Elbaz, M., Huang, S.M., and Cheng, C.P.** (2008). Transposon mutagenesis reveals differential pathogenesis of *Ralstonia solanacearum* on tomato and Arabidopsis. Mol Plant Microbe Interact **21**, 1261-1270.
- Liu, H., Zhang, S., Schell, M.A., and Denny, T.P.** (2005). Pyramiding unmarked deletions in *Ralstonia solanacearum* shows that secreted proteins in addition to plant cell-wall-degrading enzymes contribute to virulence. Mol Plant Microbe Interact **18**, 1296-1305.
- Liu, L., Yoshimura, T., Endo, K., Kishimoto, K., Fuchikami, Y., Manning, J.M., Esaki, N., and Soda, K.** (1998). Compensation for D-glutamate auxotrophy of

- Escherichia coli* WM335 by D-amino acid aminotransferase gene and regulation of *murI* expression. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**, 193-195.
- Lopes, C.A., Quezado-Soares, A.M., and de Melo, P.E.** (1994). Differential resistance of tomato cultigens to biovars I and III of *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Dis.* **78**, 1091-1094.
- Lundqvist, T., Fisher, S.L., Kern, G., Folmer, R.H., Xue, Y., Newton, D.T., Keating, T.A., Alm, R.A., and de Jonge, B.L.** (2007). Exploitation of structural and regulatory diversity in glutamate racemases. *Nature* **447**, 817-822.
- Ma, B., Reynolds, C.M., and Raetz, C.R.** (2008). Periplasmic orientation of nascent lipid A in the inner membrane of an *Escherichia coli* *lptA* mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13823-13828.
- Marie, C., Broughton, W.J., and Deakin, W.J.** (2001). *Rhizobium* type III secretion systems: legume charmers or alarmers? *Curr Opin Plant Biol* **4**, 336-342.
- Meredith, T.C., and Woodard, R.W.** (2003). *Escherichia coli* YrbH is a D-arabinose 5-phosphate isomerase. *J Biol Chem* **278**, 32771-32777.
- Miller J** (1972) *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
- Mobitz, H., and Bruice, T.C.** (2004). Multiple substrate binding states and chiral recognition in cofactor-independent glutamate racemase: a molecular dynamics study. *Biochemistry* **43**, 9685-9694.
- Mole, B.M., Baltrus, D.A., Dangi, J.L., and Grant, S.R.** (2007). Global virulence regulation networks in phytopathogenic bacteria. *Trends Microbiol* **15**, 363-371.
- Nagy, G., Danino, V., Dobrindt, U., Pallen, M., Chaudhuri, R., Emody, L., Hinton, J.C., and Hacker, J.** (2006). Down-regulation of key virulence factors makes the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *rfaH* mutant a promising live-attenuated vaccine candidate. *Infect Immun* **74**, 5914-5925.
- Narita, S.I., and Tokuda, H.** (2009). Biochemical characterization of an ABC transporter LptBFGC complex required for the outer membrane sorting of lipopolysaccharides. *FEBS Lett.*
- Nesper, J., Lauriano, C.M., Klose, K.E., Kapfhammer, D., Kraiss, A., and Reidl, J.** (2001). Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El tor *galU* and *galE* mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect Immun* **69**, 435-445.
- Newman, M.A., Dow, J.M., Molinaro, A., and Parrilli, M.** (2007). Priming, induction and modulation of plant defence responses by bacterial lipopolysaccharides. *J Endotoxin Res* **13**, 69-84.
- Ormeno-Orrillo, E., Rosenblueth, M., Luyten, E., Vanderleyden, J., and Martinez-Romero, E.** (2008). Mutations in lipopolysaccharide biosynthetic

- genes impair maize rhizosphere and root colonization of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Environ Microbiol* **10**, 1271-1284.
- Osborn, M.J., Rick, P.D., and Rasmussen, N.S.** (1980). Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. Translocation and integration of an incomplete mutant lipid A into the outer membrane. *J Biol Chem* **255**, 4246-4251.
- Poueymiro, M., Cunnac, S., Barberis, P., Deslandes, L., Peeters, N., Cazale-Noel, A.C., Boucher, C., and Genin, S.** (2009). Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host-range specificity on tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 538-550.
- Priebe, G.P., Dean, C.R., Zaidi, T., Meluleni, G.J., Coleman, F.T., Coutinho, Y.S., Noto, M.J., Urban, T.A., Pier, G.B., and Goldberg, J.B.** (2004). The *galU* Gene of *Pseudomonas aeruginosa* is required for corneal infection and efficient systemic spread following pneumonia but not for infection confined to the lung. *Infect Immun* **72**, 4224-4232.
- Pucci, M.J., Thanassi, J.A., Ho, H.T., Falk, P.J., and Dougherty, T.J.** (1995). *Staphylococcus haemolyticus* contains two D-glutamic acid biosynthetic activities, a glutamate racemase and a D-amino acid transaminase. *J Bacteriol* **177**, 336-342.
- Saile, E., McGarvey, J.A., Schell, M.A., and Denny, T.P.** (1997). Role of extracellular polysaccharide and endoglucanase in root invasion and colonization of tomato plants by *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology* **87**, 1264-1271.
- Salanoubat, M., Genin, S., Artiguenave, F., Gouzy, J., Mangenot, S., Arlat, M., Billault, A., Brottier, P., Camus, J.C., Cattolico, L., Chandler, M., Choise, N., Claudel-Renard, C., Cunnac, S., Demange, N., Gaspin, C., Lavie, M., Moisan, A., Robert, C., Saurin, W., Schiex, T., Siguier, P., Thebault, P., Whalen, M., Wincker, P., Levy, M., Weissenbach, J., and Boucher, C.A.** (2002). Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature* **415**, 497-502.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Ed 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, U.S.A.
- Schell, M.A.** (2000). Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia Solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu Rev Phytopathol* **38**, 263-292.
- Sengupta, S., Shah, M., and Nagaraja, V.** (2006). Glutamate racemase from *Mycobacterium tuberculosis* inhibits DNA gyrase by affecting its DNA-binding. *Nucleic Acids Res* **34**, 5567-5576.
- Shang, Y., Li, X., Cui, H., He, P., Thilmony, R., Chintamanani, S., Zwiesler-Vollick,**

- J., Gopalan, S., Tang, X., and Zhou, J.M.** (2006). RAR1, a central player in plant immunity, is targeted by *Pseudomonas syringae* effector AvrB. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19200-19205.
- Soscia, C., Hachani, A., Bernadac, A., Filloux, A., and Bleves, S.** (2007). Cross talk between type III secretion and flagellar assembly systems in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **189**, 3124-3132.
- Soto, M.J., Sanjuan, J., and Olivares, J.** (2006). *Rhizobia* and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology* **152**, 3167-3174.
- Sperandeo, P., Pozzi, C., Deho, G., and Polissi, A.** (2006). Non-essential KDO biosynthesis and new essential cell envelope biogenesis genes in the *Escherichia coli* *yrbG-yhbG* locus. *Res Microbiol* **157**, 547-558.
- Sperandeo, P., Cescutti, R., Villa, R., Di Benedetto, C., Candia, D., Deho, G., and Polissi, A.** (2007). Characterization of *lptA* and *lptB*, two essential genes implicated in lipopolysaccharide transport to the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**, 244-253.
- Sperandeo, P., Lau, F.K., Carpentieri, A., De Castro, C., Molinaro, A., Deho, G., Silhavy, T.J., and Polissi, A.** (2008). Functional analysis of the protein machinery required for transport of lipopolysaccharide to the outer membrane of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**, 4460-4469.
- Stavrinos, J., McCann, H.C., and Guttman, D.S.** (2008). Host-pathogen interplay and the evolution of bacterial effectors. *Cell Microbiol* **10**, 285-292.
- Strom, M.S., and Lory, S.** (1993). Structure-function and biogenesis of the type IV pili. *Annu Rev Microbiol* **47**, 565-596.
- Suits, M.D., Sperandeo, P., Deho, G., Polissi, A., and Jia, Z.** (2008). Novel structure of the conserved gram-negative lipopolysaccharide transport protein A and mutagenesis analysis. *J Mol Biol* **380**, 476-488.
- Tang, X., Xiao, Y., and Zhou, J.M.** (2006). Regulation of the type III secretion system in phytopathogenic bacteria. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 1159-1166.
- Tans-Kersten, J., Huang, H., and Allen, C.** (2001). *Ralstonia solanacearum* needs motility for invasive virulence on tomato. *J Bacteriol* **183**, 3597-3605.
- Thomsen, L.E., Chadfield, M.S., Bispham, J., Wallis, T.S., Olsen, J.E., and Ingmer, H.** (2003). Reduced amounts of LPS affect both stress tolerance and virulence of *Salmonella enterica* serovar Dublin. *FEMS Microbiol Lett* **228**, 225-231.
- Titarenko, E., Lopez-Solanilla, E., Garcia-Olmedo, F., and Rodriguez-Palenzuela, P.** (1997). Mutants of *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum* sensitive to antimicrobial peptides are altered in their lipopolysaccharide structure and are avirulent in tobacco. *J Bacteriol* **179**, 6699-6704.
- Tsai JW, Hsu ST, Chen LC** (1985) Bacteriocin-producing strains of *Pseudomonas*

- solanacearum* and their effect on development of bacterial wilt of tomato. Plant Prot. Bull. (Taiwan) **27**: 267-268
- Tran, A.X., Trent, M.S., and Whitfield, C.** (2008). The LptA protein of *Escherichia coli* is a periplasmic lipid A-binding protein involved in the lipopolysaccharide export pathway. J Biol Chem **283**, 20342-20349.
- Troisfontaines, P., and Cornelis, G.R.** (2005). Type III secretion: more systems than you think. Physiology (Bethesda) **20**, 326-339.
- Valls, M., Genin, S., and Boucher, C.** (2006). Integrated regulation of the type III secretion system and other virulence determinants in *Ralstonia solanacearum*. PLoS Pathog **2**, e82.
- Varbanets, L.D., Vasil'ev, V.N., and Brovarskaia, O.S.** (2003). [Characterization of lipopolysaccharides from *Ralstonia solanacearum*]. Mikrobiologiya **72**, 19-25.
- Varbanets, L.D., Gvozdiak, R.I., Muras, V.A., Brovarskaia, O.S., and Zhitkevich, N.V.** (1997). [The chemical composition and biological activity of the glyco polymers in *Ralstonia solanacearum* (Yabuchi et al., 1995)]. Mikrobiol Z **59**, 13-21.
- Vasse, J., Genin, S., Frey, P., Boucher, C., and Brito, B.** (2000). The *hrpB* and *hrpG* regulatory genes of *Ralstonia solanacearum* are required for different stages of the tomato root infection process. Mol Plant Microbe Interact **13**, 259-267.
- Vasse, J., Vasse, J., Frey, P., and Trigalet, A.** (1995). Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. Mol. Plant-Microbe Interact. **8**, 241-251.
- Vinatzer, B.A., Teitzel, G.M., Lee, M.W., Jelenska, J., Hotton, S., Fairfax, K., Jenrette, J., and Greenberg, J.T.** (2006). The type III effector repertoire of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a and its role in survival and disease on host and non-host plants. Mol Microbiol **62**, 26-44.
- West, N.P., Sansonetti, P., Mounier, J., Exley, R.M., Parsot, C., Guadagnini, S., Prevost, M.C., Prochnicka-Chalufour, A., Delepierre, M., Tanguy, M., and Tang, C.M.** (2005). Optimization of virulence functions through glucosylation of *Shigella* LPS. Science **307**, 1313-1317.
- Whatley, M.H., Hunter, N., Cantrell, M.A., Hendrick, C., Keegstra, K., and Sequeira, L.** (1980). Lipopolysaccharide composition of the wilt pathogen, *Pseudomonas solanacearum*: CORRELATION WITH THE HYPERSENSITIVE RESPONSE IN TOBACCO. Plant Physiol **65**, 557-559.
- Woods, S.A., Schwartzbach, S.D., and Guest, J.R.** (1988). Two biochemically distinct classes of fumarase in *Escherichia coli*. Biochim Biophys Acta **954**, 14-26.
- Wu, J., and Woodard, R.W.** (2003). *Escherichia coli* YrbI is 3-deoxy-D-manno-octulosonate 8-phosphate phosphatase. J Biol Chem **278**,

18117-18123.

Yao, J., and Allen, C. (2007). The plant pathogen *Ralstonia solanacearum* needs aerotaxis for normal biofilm formation and interactions with its tomato host. *J Bacteriol* **189**, 6415-6424.

Yoshimura, T., Ashiuchi, M., Esaki, N., Kobatake, C., Choi, S.Y., and Soda, K. (1993). Expression of *glr* (*murI*, *dga*) gene encoding glutamate racemase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **268**, 24242-24246.

Zdorovenko, E.L., Vinogradov, E., Wydra, K., Lindner, B., and Knirel, Y.A. (2008). Structure of the oligosaccharide chain of the SR-type lipopolysaccharide of *Ralstonia solanacearum* Toudk-2. *Biomacromolecules* **9**, 2215-2220.



表一、青枯病菌 *RSc0411* 研究所使用的菌株與質體

Strains/plasmids	Description ^b	Source or reference
<i>R. solanacearum</i> strains		
Pss190	Wild type, phylotype I, biovar 4	Jaunet and Wang 1999
Pss4	Wild type, phylotype I, biovar 3	Jaunet and Wang 1999
<i>RSc0411</i>	<i>RSc0411::Tn5 (nptII)</i> , Kan ^r , in Pss190 or Pss4 background	Lin <i>et al.</i> , 2008
<i>rfaF</i>	<i>rfaF::Tn5 (nptII)</i> , Kan ^r , in Pss190 background	Lin <i>et al.</i> , 2008
<i>hrpG</i>	<i>hrpG::Tn5 (nptII)</i> , Kan ^r , in Pss190 background	Lin <i>et al.</i> , 2008
<i>phcA</i>	<i>phcA::Tn5 (nptII)</i> , Kan ^r , in Pss190 background	Lin <i>et al.</i> , 2008
<i>RSc1206</i>	<i>RSc1206::Tn5 (nptII)</i> , Kan ^r , in Pss190 background	Lin <i>et al.</i> , 2008
<i>E. coli</i> strain		
DH5α	Transient host of different constructs	Hanahan 1983
Plasmid^a		
pUFR047	<i>incW</i> Gen ^r Amp ^r <i>mob</i> ⁺ <i>Pmob</i> <i>lacZA</i> ⁺ <i>par</i> ⁺	DeFeyter <i>et al.</i> , 1993
pURs190	pUFR047 clone containing <i>R. solanacearum</i> Pss190 <i>RSc0411</i>	This study
pURs4	pUFR047 clone containing <i>R. solanacearum</i> Pss4 <i>RSc0411</i>	This study

pUXcv	pUFR047 clone containing <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> XCV3115	This study
pUCt	pUFR047 clone containing <i>Cupriavidus taiwanensis</i> RALTA_A0334	This study
pURme	pUFR047 clone containing <i>Ralstonia metallidurans</i> Rmet_0306	This study
pUReu	pUFR047 clone containing <i>Ralstonia eutropha</i> H16 H16_A0390	This study
pUEcc	pUFR047 clone containing the <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i> homologue of <i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i> ECA0292	This study
pUE.coli	pUFR047 clone containing <i>Escherichia coli</i> <i>lptC</i>	This study
pCZ962	vector containing a promoterless <i>LacZ</i> reporter for promoter activity assay, Tet ^r	Provided by C. Boucher
pC0409	pCZ962 carrying the putative promoter sequence (nt. 437941-438400) upstream of <i>R. Solanacearum</i> Pss190 RSc0409, Tet ^r	This study
pC0410	pCZ962 carrying the putative promoter sequence (nt. 438541-439038) upstream of <i>R. Solanacearum</i> Pss190 RSc0410, Tet ^r	This study
pC0411	pCZ962 carrying the putative promoter sequence (nt. 439234-439633) upstream of <i>R. Solanacearum</i> Pss190 RSc0411, Tet ^r	This study
pC0412	pCZ962 carrying the putative promoter sequence (nt. 439807-440180) upstream of <i>R. Solanacearum</i> Pss190 RSc0412, Tet ^r	This study

pC0413

pCZ962 carrying the putative promoter sequence (nt. 440851-441166) upstream
of *R. Solanacearum* Pss190 RSc0413, Tet^r

This study

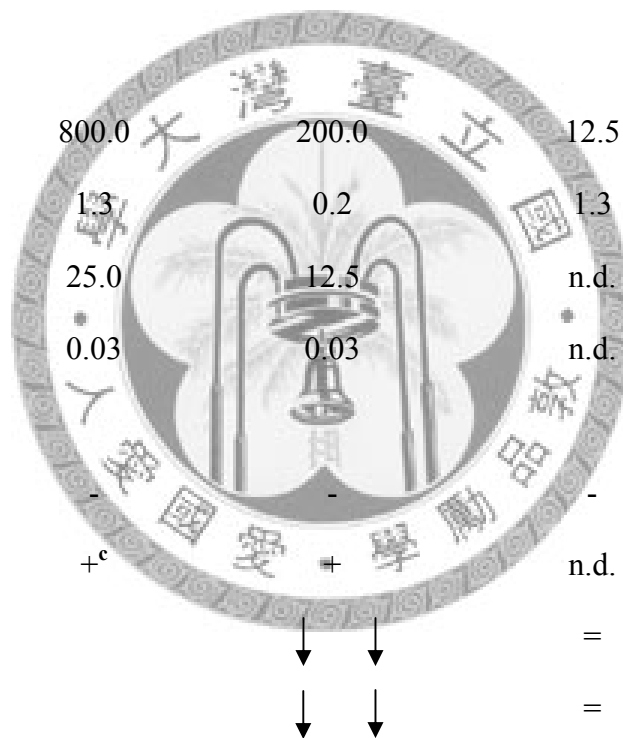
^a The target gene and sequences isolated from various bacteria were cloned into the indicated sites of pUFR047. The promoter sequences were cloned into the *Hind*III and *Xba*I site of pCZ962.

^b Amp^r, ampicillin resistance; Gen^r, gentamicin resistance; Tet^r, tetracycline resistance; Kan^r, kanamycin resistance.



表二、青枯病菌野生株與 *RSc0411* 及 *rfaF* 突變株的特性比較

Characteristics tested	In Pss190 background			In Pss4 background	
	WT	<i>RSc0411</i> mutant	<i>rfaF</i> mutant	WT	<i>RSc0411</i> mutant
Growth in liquid minimal medium (M9) ^a		=	n.d.		=
Stress response (MIC) ^b					
polymyxin B (ppm)	800.0	200.0	12.5	n.d.	n.d.
tyrothricin (ppm)	1.3	0.2	1.3	n.d.	n.d.
chloramphenicol (ppm)	25.0	12.5	n.d.	n.d.	n.d.
H ₂ O ₂ (mM)	0.03	0.03	n.d.	n.d.	n.d.
Motility					
swimming (ratio) ^c	-	-	-	1	0.77±0.05
twitching	+ ^c	+	n.d.	+	+
Root attachment ^d		↓	=		↓
Biofilm ^d		↓	=		=
APIZYM™ ^d		=	n.d.	n.d.	n.d.
Secreted enzymes ^e					



Egl (cm)	2.2	2.1	n.d.	n.d.	n.d.
Peh (cm)	1.0	1.0	n.d.	n.d.	n.d.
Pme (cm)	0	0	n.d.	n.d.	n.d.
Proliferation in <i>N. benthamiana</i> ^f	8.90±0.30	8.70±0.03	n.d.	n.d.	n.d.
Colonization in tomato			n.d.	n.d.	n.d.
HR in W38 (24hpi) ^g	+	-	+	-	-
<i>N. benthamiana</i> response (72hpi) ^h	N	C	C	N	N

^a The overall bacterial growth was monitored over time for 7 days by measuring OD₆₀₀. n.d., not determined.

^b MIC, minimal concentration of the chemical to completely inhibit bacterial growth in 523 liquid medium after incubation for 16 hrs.

^c -, no swimming activity. Swimming activity of the mutant in Pss4 background was evaluated as ratio with the wild-type strain as 1.0. +, positive twitching activity.

^d =, mutant showed no significant difference from the WT strain; ↓, mutant displayed reduced phenotype compared to the WT strain.

^e Diameter of substrate digestion zone. Egl, endoglucanase; Peh, polygalacturonase; Pme, pectin methylesterase.

^f Bacterial proliferation [\log_{10} (CFU/gram plant tissues)] in leaves 24 hours after infiltration.

^g Response of infiltrated W38 leaves was evaluated 24 hours post inoculation. HR, hypersensitive response; +, HR ;-, no response.

^h Response of infiltrated *N. benthamiana* leaves was evaluated 72 hours post inoculation. N, necrosis; C, chlorosis.

表三、參與脂多醣生合成相關基因之序列比較

	<i>R.</i> <i>solanacearum</i> GMI1000	<i>R.</i> <i>metallidurans</i>	<i>C.</i> <i>taiwanensis</i>	<i>R.</i> <i>eutropha</i>	<i>X.</i> <i>compestris</i> pv. vesctoria	<i>P.</i> <i>syringae</i> pv. tomato	<i>P.</i> <i>aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. carotovora</i> subsp. <i>atroseptica</i>
lipid A biogenesis	RSc1416 (lpxA)	75/86 ^a	77/87	77/87	(49/66) ^b	46/60	47/62	lpxA	47/63
	RSc1417 (lpxB)	75/85	75/83	74/84	(38/53)	47/64	47/63	lpxB	38/59
	RSc2837 (lpxC)	88/93	89/93	88/92	(56/72)	54/72	55/73	lpxC	54/74
	RSc1414 (lpxD)	70/81	70/80	70/80	(42/57)	40/59	43/61	lpxD	41/58
	RSc2530 (lpxK)	65/78	67/78	67/78	41/52	38/51	39/50	lpxK	37/51
	RSc0693	58/68	57/68	58/71	(32/43)	40/53	40/52	kdtA/WaaA	37/52

	(kdtA)							38/52	
	RSc1127	86/93	87/93	87/92	70/82	45/64	46/66	kdsA	(44/65)
	(kdsA)							(44/65)	
	RSc2532	72/78	73/79	73/81	(45/56)	56/63	55/63	kdsB	52/62
	(kdsB)							51/61	
	RSc0565	75/86	76/86	76/86	(26/41)	46/61	45/62	RfaF/WaaF	43/56
	(RfaF)							43/58	
	RSc0692	45/58	42/57	42/56	(23/42)	38/53	36/52	WaaC	37/52
core	(RfaC1)							39/54	
biogenesis	RSc2920	(26/42)	39/53	40/56	(28/42)	39/54	35/54	WaaR	35/53
	(RfaJ)							35/50	
	RSc2084	84/91	85/89	85/90	(34/49)	32/46	48/65	WaaG	(15/27)
								(16/24)	
O-antigen	RSc2204	23/38	30/48	26/42	25/41	16/24	(11/19)	WaaL	(10/19)
ligation								11/21	
LPS	RSc2200	74/86	76/87	78/88	(37/59)	38/59	38/60	MsbA	41/63

								40/65	
	RSc0409	86/91 ^a	85/89	85/91	62/77	59/77	58/75	LptB	56/77
								58/79	
	RSc0410	67/78	69/79	71/81	24/41	25/44	25/45	LptA	20/44
								26/45	
	RSc0411	64/76	60/76	61/75	22/38	19/34	18/39	LptC	(16/33)
								(18/35)	
transport	RSc2416	73/86	72/84	70/83	(23/37)	29/49	28/46	LptF/YjgP	26/45
								26/46	
	RSc2417	69/82	70/83	70/83	(25/44)	26/46	25/46	LptG/YjgQ	24/47
								25/46	
	RSc2743	64/77	64/77	63/76	28/44	24/44	23/45	LptE/RlpB	26/41
								20/39	
	RSc0515	54/68	55/70	55/69	27/43	28/42	27/42	LptD/Imp	25/43
								24/42	

^a Sequence identity/similarity is shown as %. Protein sequence alignments were mostly carried out using the PHI- and PSI-BLAST algorithm

(<http://www.ebi.ac.uk/Tools/blastpgp/index.html>) which list only the first 250 orthologues based on level of sequence homology.

^b For orthologues sharing lower sequence homology and thus not revealed by this algorithm, NCBI BLAST

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sutils/genom_table.cgi) was used to perform pair-wise sequence comparison and calculate the sequence homology.

n.f., no protein with significant sequence homology was found in the genome based on NCBI database search.



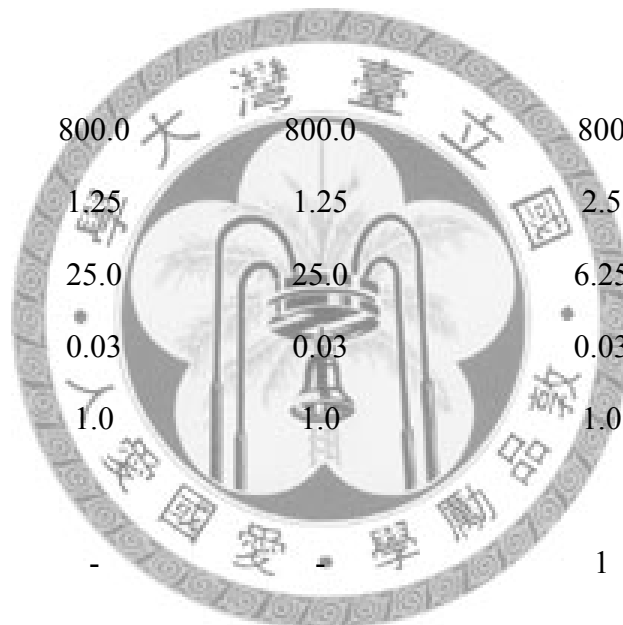
表四、青枯病菌 *murI* 研究所使用的菌株與質體

Strains/plasmids	Description ^a	Source or reference
<i>R. solanacearum</i> strains		
Pss190	Wild type, phylotype I, biovar 4	Jaunet and Wang 1999
Pss4	Wild type, phylotype I, biovar 3	Jaunet and Wang 1999
Pss1308	Wild type, phylotype I, biovar 3	Jaunet and Wang 1999
<i>murI</i>	<i>murI::Tn5 (nptII)</i> , Kan ^r , in Pss190 or Pss4 or Pss1308 background	Lin <i>et al.</i> 2008
<i>E. coli</i> strain		
DH5α	Transient host of different constructs	Hanahan 1983
Plasmid		
pUFR047	<i>incW Gen^r Amp^r mob⁺ Pmob lacZA⁺ par⁺</i>	This study
pUmurI 50	pUFR047 clone containing <i>R. solanacearum</i> Pss4 <i>murI</i> 50	This study
pUmurI 300	pUFR047 clone containing <i>R. solanacearum</i> Pss4 <i>murI</i> 300	This study
pUmurI 500	pUFR047 clone containing <i>R. solanacearum</i> Pss4 <i>murI</i> 500	This study
pUfumA- <i>murI</i>	pUFR047 clone containing <i>R. solanacearum</i> Pss4 <i>fumA</i> - <i>murI</i>	This study

^a Amp^r, ampicillin resistance; Gen^r, gentamicin resistance; Kan^r, kanamycin resistance.

表五、青枯病菌野生株與 *murI* 突變株的特性比較總表

Characteristics tested	In Pss190 background		In Pss4 background	
	WT	<i>murI</i> mutant	WT	<i>murI</i> mutant
Growth in liquid minimal medium (M9) ^a		=		=
Stress response (MIC) ^b				
polymyxin B (ppm)	800.0	800.0	800	800
tyrothricin (ppm)	1.25	1.25	2.5	2.5
chloramphenicol (ppm)	25.0	25.0	6.25	6.25
H ₂ O ₂ (mM)	0.03	0.03	0.03	0.03
EDTA (mM)	1.0	1.0	1.0	1.0
Motility ^c				
swimming (ratio)	-	-	1	0.38±0.02
twitching	+	+	+	+
Biofilm ^d		=		=
Root attachment ^d		=		=
APIZYM™ ^d		=		=



Secreted enzymes ^e				
Egl (cm)	1.6	1.5	1.3	1.2
Peh (cm)	0.6	0.6	0.6	0.5
Pme (cm)	0	0	1.3	1.4
Proliferation in <i>N. benthamiana</i> ^f	n.d.	n.d.	10.0±0.06	9.9±0.04
HR in W38 (24hpi) ^g	+	+	+	+
<i>N. benthamiana</i> response (72hpi) ^h	N	N	N	N

^a The overall bacterial growth was monitored over time for 7 days by measuring OD₆₀₀. n.d., not determined.

^b MIC, minimal concentration of the chemical to completely inhibit bacterial growth in 523 liquid medium after incubation for 16 hrs.

^c -, no swimming activity. Swimming activity of the mutant in Pss4 background was evaluated as ratio with the wild-type strain as 1.0. +, positive twitching activity.

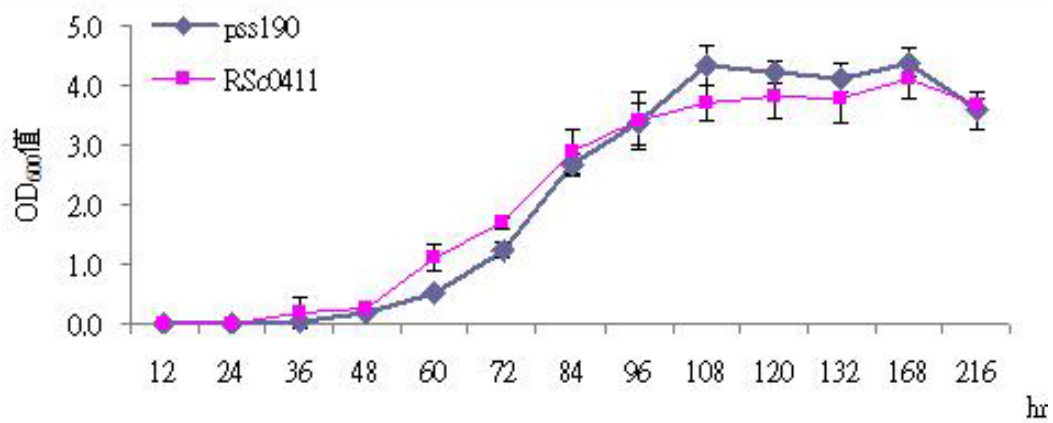
^d =, similar enzymatic activities with the wild-type strain.

^e Diameter of substrate digestion zone. Egl, endoglucanase; Peh, polygalacturonase; Pme, pectin methylesterase.

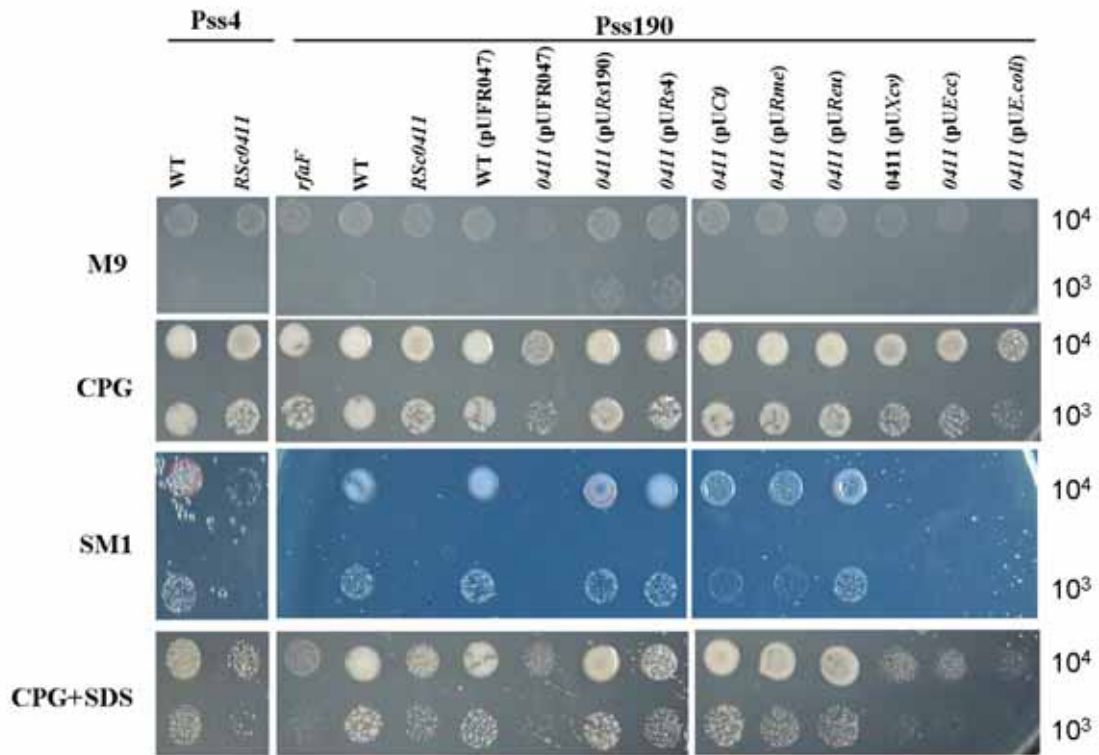
^f Bacterial proliferation [$\log_{10}(\text{CFU}/\text{gram plant tissues})$] in leaves 24 hours after infiltration.

^g Response of infiltrated W38 leaves was evaluated 24 hours post inoculation. HR, hypersensitive response; +, HR.

^h Response of infiltrated *N. benthamiana* leaves was evaluated 72 hours post inoculation. N, necrosis.

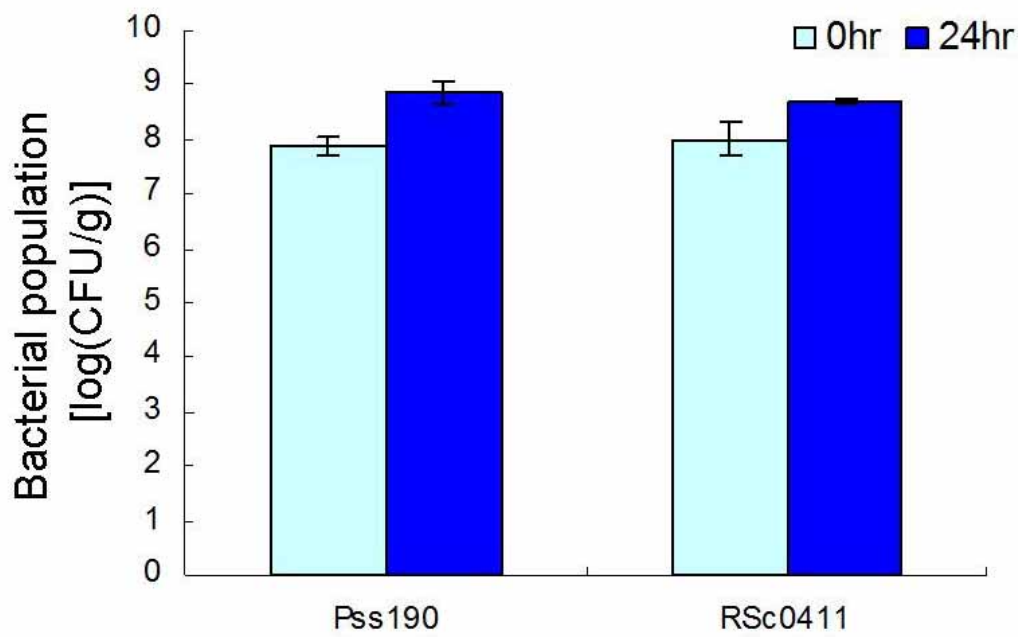


圖一、青枯病菌野生型菌株 Pss190 和其 *RSc0411* 突變株的生長曲線。
 利用營養貧瘠液體培養基(M9)培養野生型菌株 Pss190 和 *RSc0411* 突變株所測得之
 生長曲線。此實驗已重複三次，由三次的實驗結果計算其標準偏差。



圖二、青枯病菌各個菌株在不同固體培養基下的生長情形。

取青枯病菌濃度約 10^3 和 10^4 CFU/mL 的菌液 $10 \mu\text{L}$ 滴在營養貧瘠(M9)、營養豐富(CPG)、含有細胞結構相關的逆境的營養豐富固體培養基(CPG+SDS、SM1)上，靜置於在 28 生長箱二至三天。本實驗已經重複三次以上，各菌株在三次實驗中趨勢皆相同。

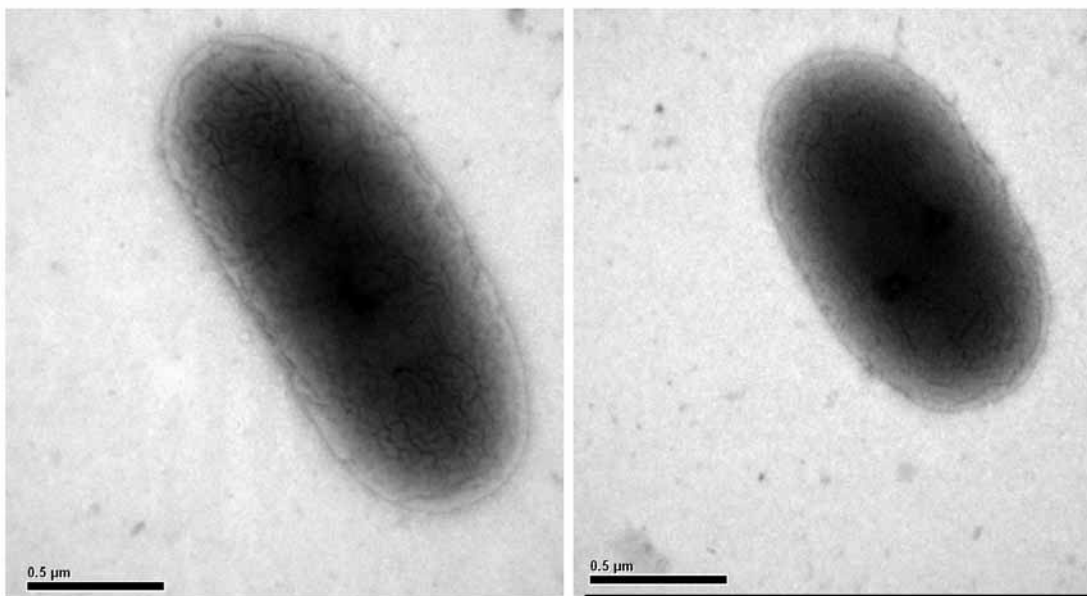


圖三、野生型菌株和 RSc0411 突變株在菸草 *N. benthamiana* 內的增生

野生型菌株和 RSc0411 突變株在注入菸草 *N. benthamiana* 葉肉組織的 0、24 小時取菸草組織測植物體內青枯病菌含量。本實驗已經重複三次(每個菌株每次有 4 棵植株)，利用三次的實驗結果計算其標準偏差。

(A)

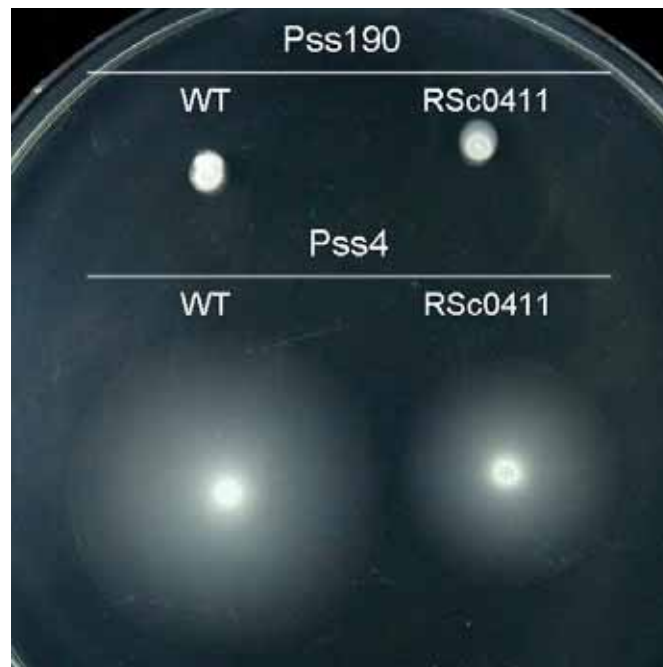
(B)



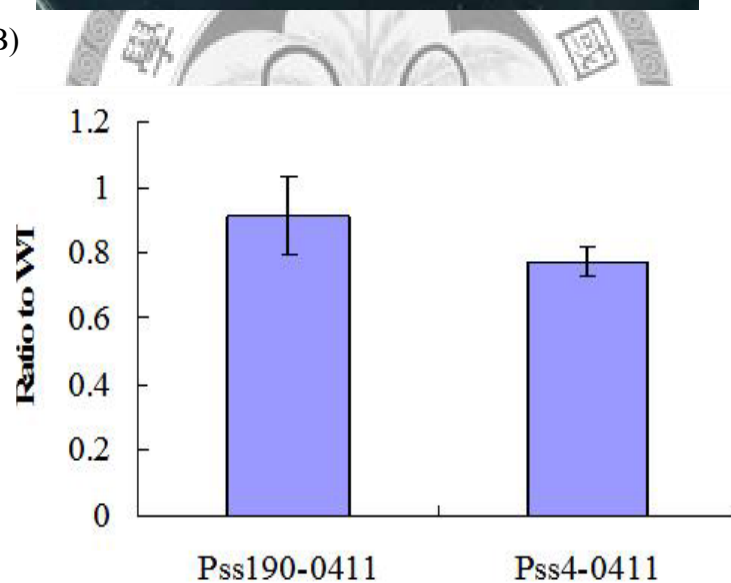
圖四、穿透式電子顯微鏡觀察青枯病菌野生型菌株和 *RSc0411* 突變株細胞膜型態

(A) 野生型菌株 Pss190 和(B) *RSc0411* 突變株。比例尺為 0.5 μm。

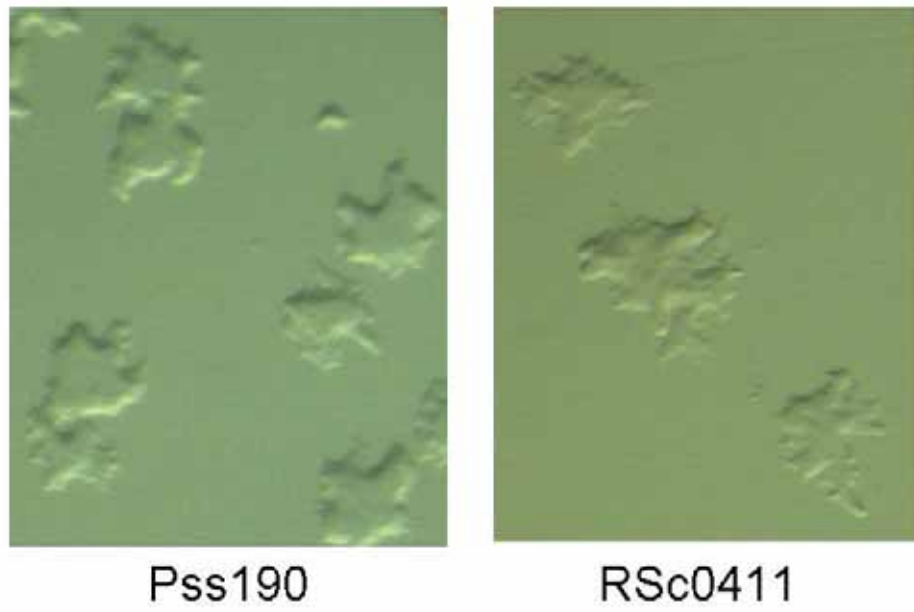
(A)



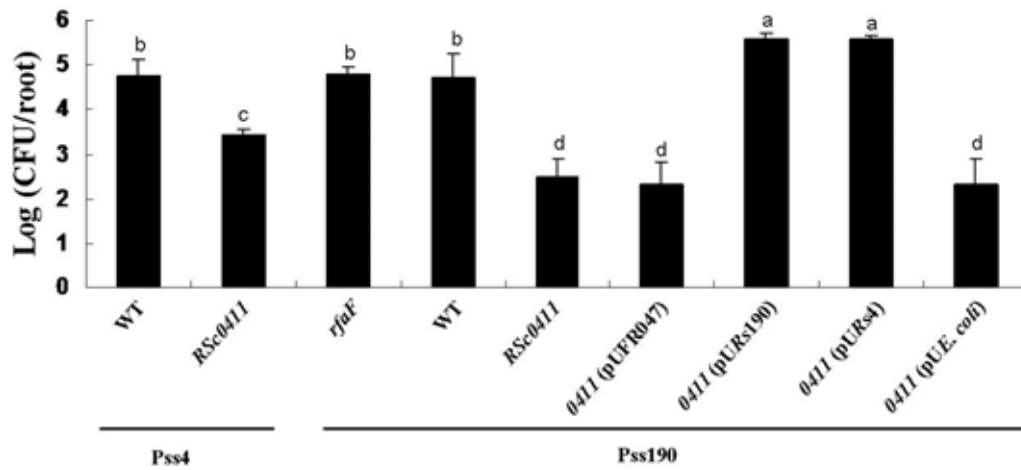
(B)



圖五、青枯病菌野生型菌株和 *RSc0411* 突變株游動力(swimming motility)測試
(A)野生型菌株和 *RSc0411* 突變株在 0.3% agar 上測試其游動力。(B) Pss190 與 Pss4 背景下 *RSc0411* 突變株游動直徑和其野生型菌株比較，以野生型菌株為 1 的比值呈現。本實驗以重複三次以上，利用三次的實驗結果計算其標準偏差。

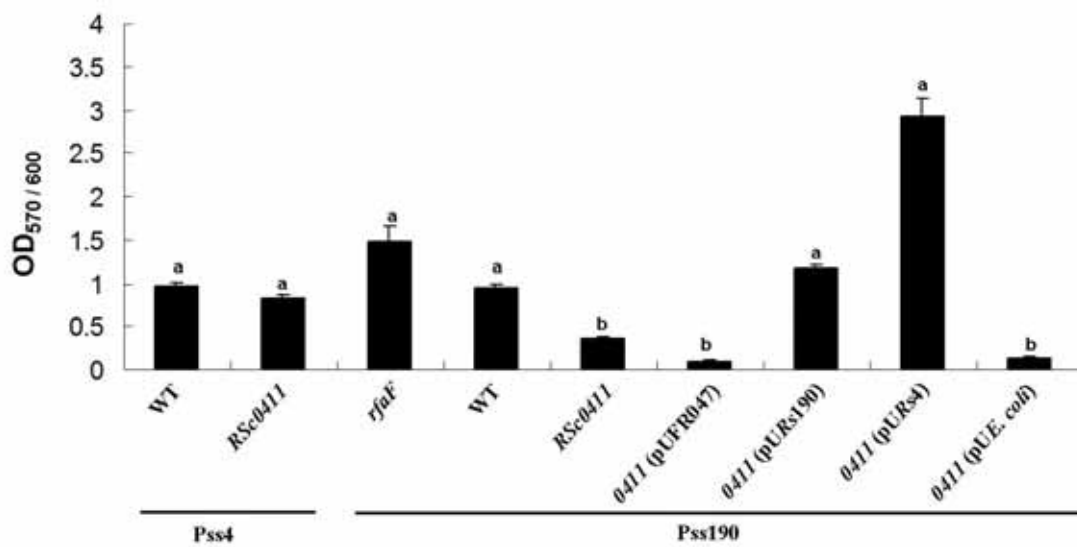


圖六、青枯病菌野生型菌株和 *RSc0411* 突變株游動力(twitching motility)測試



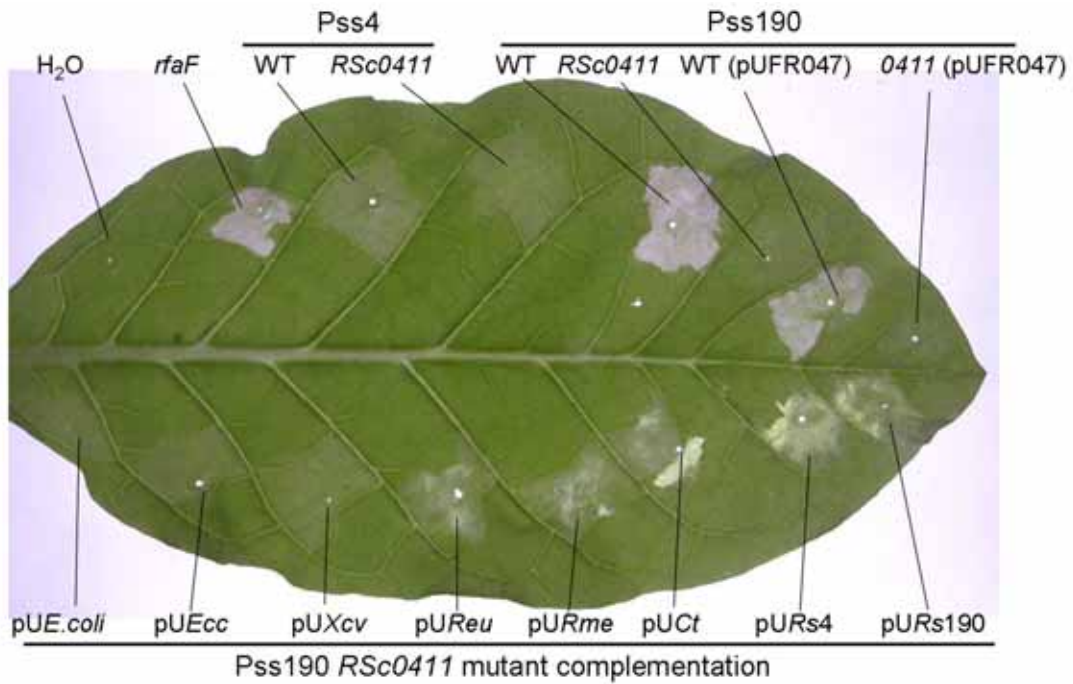
圖七、青枯病菌野生型菌株、RSc0411 突變株和其各式互補株對番茄根部著附著力分析

番茄幼根感染青枯病菌各菌株 4 小時後，測量幼根的表面附著的菌量，並以指數 (Log₁₀) 表示。本實驗已經重複三次，由三次的實驗結果計算其標準偏差，並且以統計 SAS 程式 ANOVA 加以分析分群，共可以分成四群 a、b、c、d。

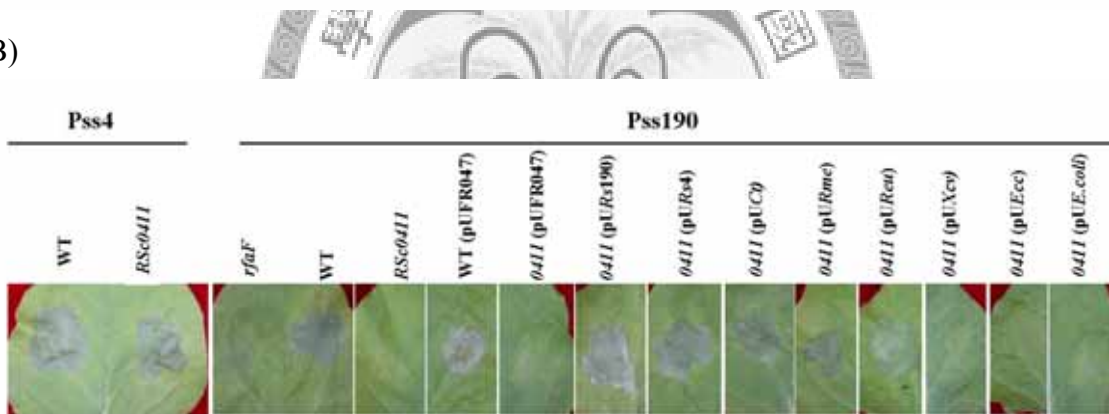


圖八、青枯病菌野生型菌株、*RSc0411* 突變株和互補株生物膜形成能力之分析
 每次實驗每個菌株皆重複九次，此實驗已經重複三次，由三次的實驗結果(共 27
 個數值)計算其標準偏差，並且以統計 SAS 程式 ANOVA 加以分析分群，共可以
 分成兩群 a、b。

(A)



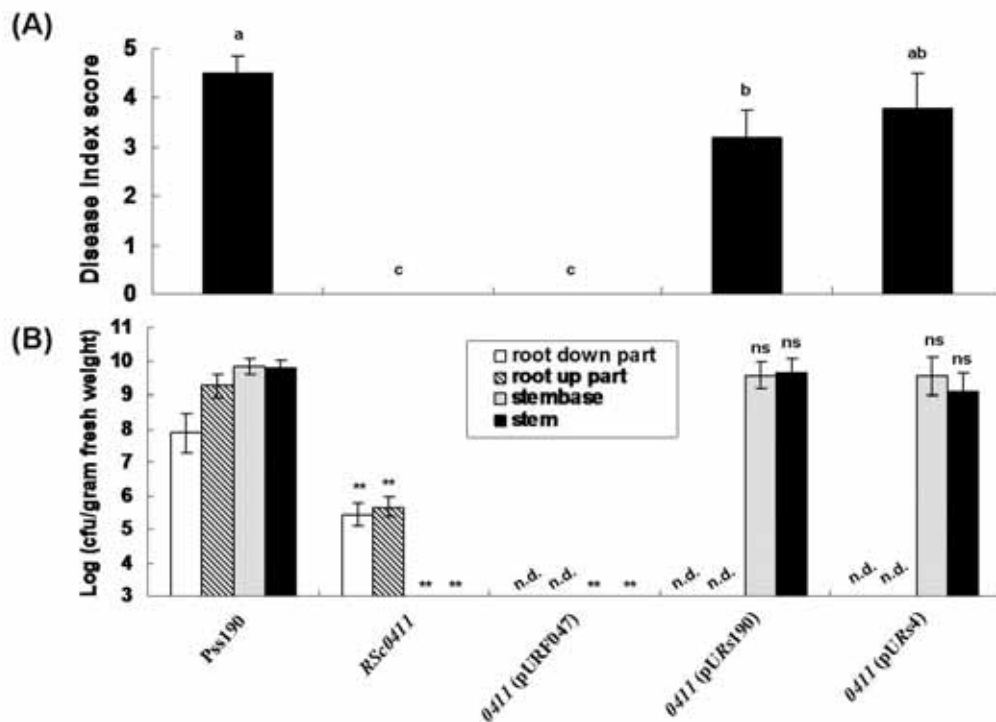
(B)



圖九、青枯病菌野生型菌株、*RSc0411* 突變株和互補株對菸草的反應分析

(A)將青枯病菌各個菌株注入菸草 Wisconsin 38 (W38)，24 小時後產生過敏性反應。(B)

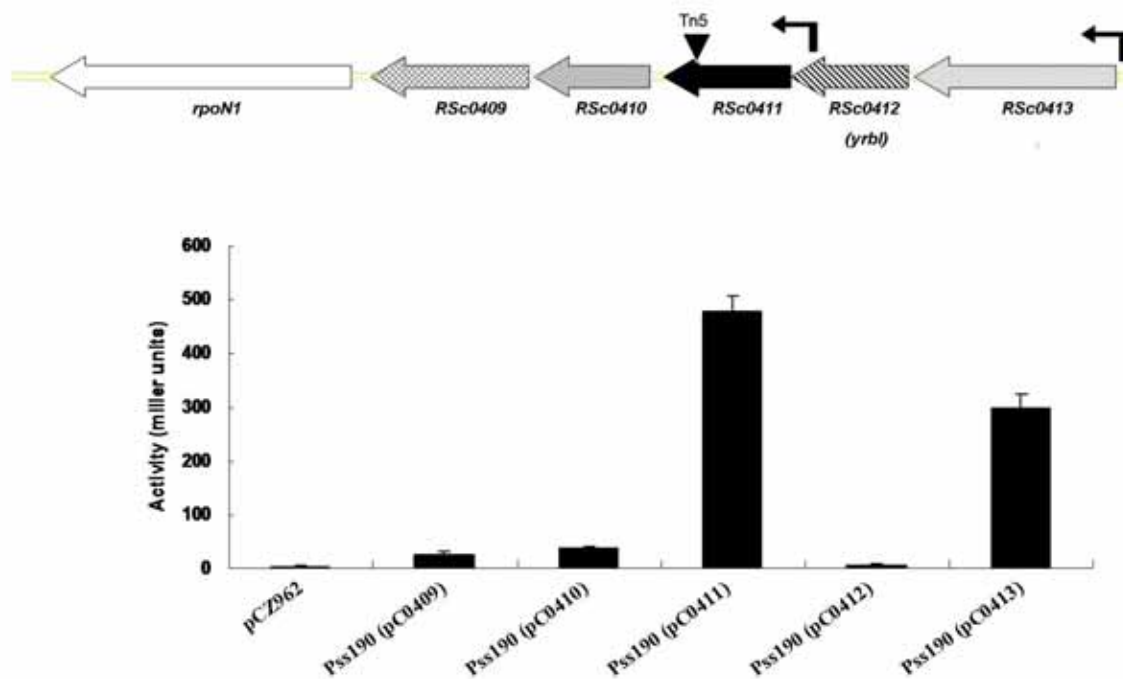
將青枯病菌各個菌株注入菸草 *N. benthamiana* 72 小時後，葉片產生壞死(necrosis)或者黃化(chlorosis)病徵。



圖十、青枯病菌野生型菌株、*RSc0411* 突變株及互補株番茄病原性測試

(A) 三個星期大的番茄進行根部澆灌青枯病菌，七日後計算番茄萎凋指數，萎凋指數共分 0 到 5 級，第 0 級即毫無病徵，第 1 級即一片葉子萎凋，第 2 級即兩到三片葉子萎凋，第 3 級即除了頂葉沒有萎凋外其他葉子皆萎凋，第 4 級即整棵植物萎凋，第 5 級即植物已經腰折乾枯死亡。本實驗已重複三次，每次每個菌株澆灌 6 棵植株，由三次的實驗結果(18 棵植株)計算其標準偏差，並且以統計 SAS 程式 ANOVA 分析分群，共可以分成三群 a、b、c。

(B) 三個星期大的番茄進行根部澆灌青枯病菌，七日後測量植株根上部、根下部、莖基部、莖部所含的青枯病菌菌量，菌量以 $\text{Log}_{10}(\text{CFU}/\text{gram plant tissues})$ 呈現，本實驗已重複三次，利用三次的實驗結果(共 18 棵植株)計算其標準偏差，並以統計 Student *t*-test method 分析，以野生型菌株 Pss190 為比較對象，** 表示有顯著差異 ($P < 0.001$)，n.s.表示無顯著差異，n.d.表示未進行測量。



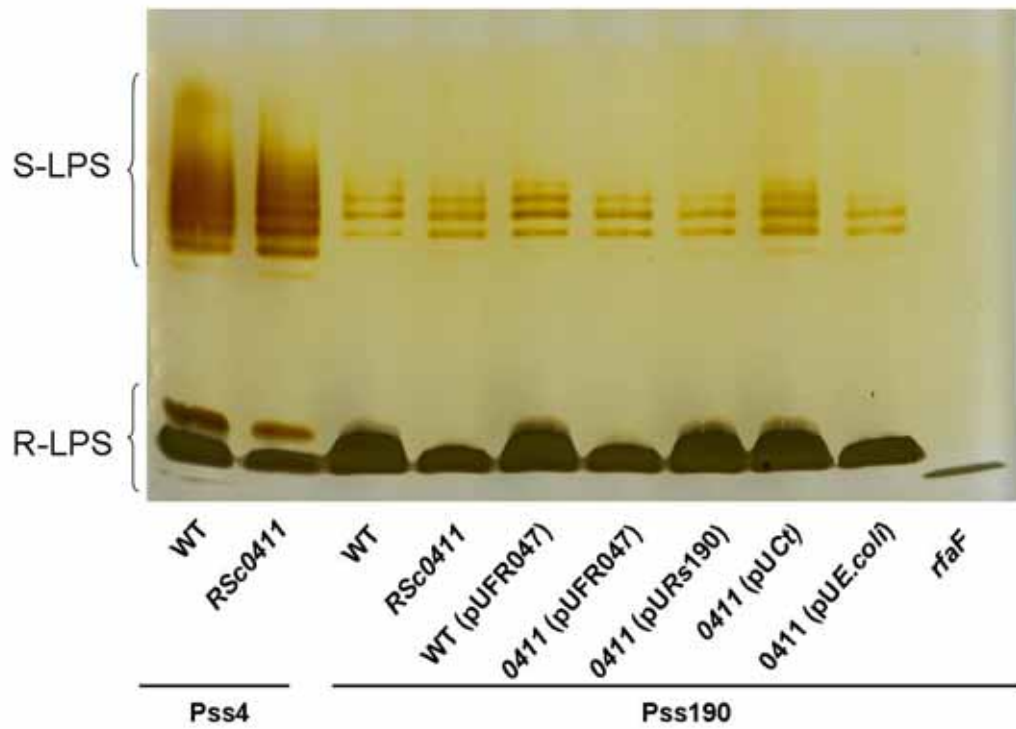
圖十一、青枯病菌 RSc0409~RSc0413 之操縱子 (operon) 結構

利用啟動子搭配 β -galactosidase 分析法檢測野生青枯病菌菌株中 *RSc0409*~*RSc0413* 之操縱子結構。轉折箭號表啟動子所在位置。本實驗以重複三次以上，利用三次的實驗結果計算其標準偏差。

RSc0411	1	MASER	SQRLVSSLLQIMLRGLPILLMAV	VCGVTFLLVQVNT	PQTEETANQAKR	-HVADYT	59
E coli LptC	1	MSKARR	-----WVIVLSLAVLVMIGI	NMAEKDDTAQVVVNNND	PTTK		43
RSc0411	60	MDGIS	ATALDERGVTKYRF	TGVHMNHYE	DDLT	YDVT	118
E coli LptC	44	SEHTD	TLVYNPEGALS	YRLIAQHVEYYS	DQAVSWF	TQPV	103
RSc0411	119	NGEGS	IIDL	YDNAK	VVR	AQGF	178
E coli LptC	104	TNDR	-MLY	LYGHVE	VN	-ALVP	156
RSc0411	179	NANGL	VFNN	-VTRQV	QL	IGNVR	210
E coli LptC	157	NSSGL	KMRGNLRS	KNAE	L	EKV	191

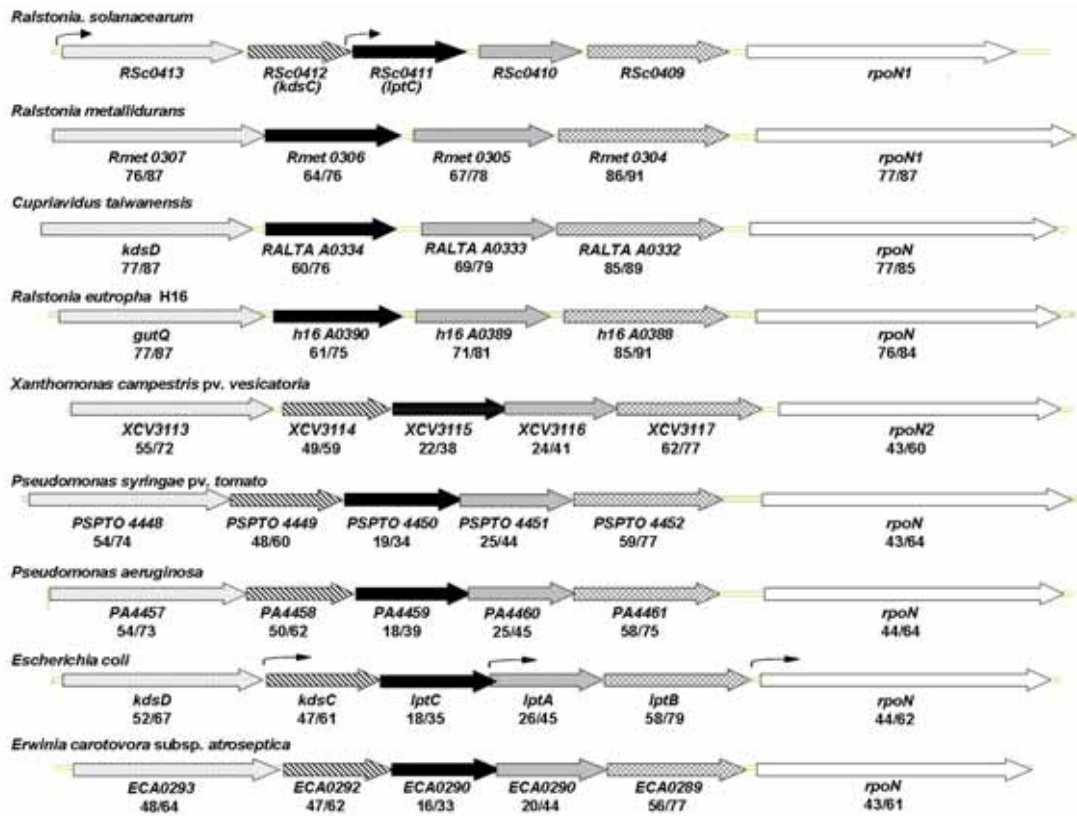
圖十二、青枯病菌 RSc0411 與大腸桿菌 LptC 胺基酸序列比對

圖中黑色區域代表相同的胺基酸，灰色區域代表胺基酸性質相似，經由電腦軟體的比對與計算可知青枯病菌 RSc0411 與大腸桿菌 LptC 的 identity (只計算黑色區域) 有 18%，similarity (計算灰色和黑色區域) 有 35%。



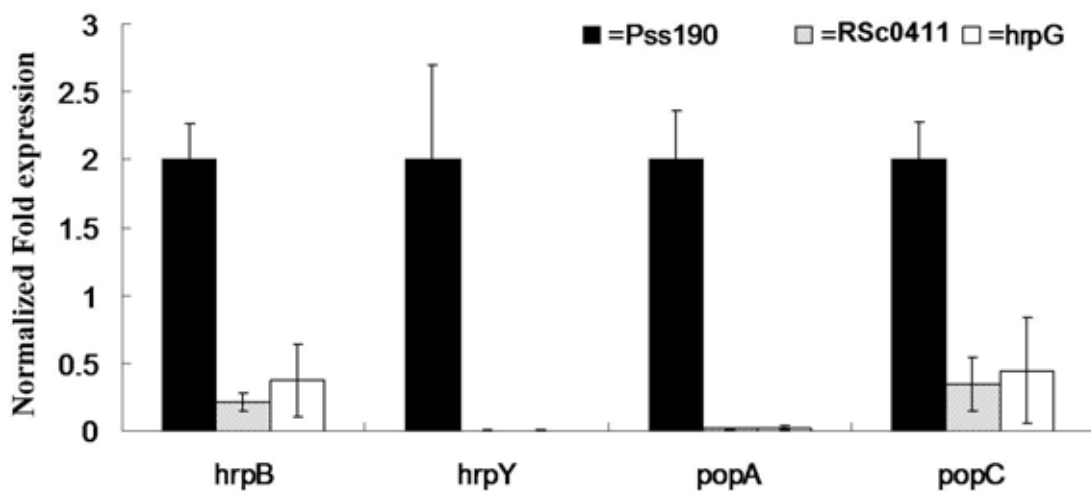
圖十三、利用銀染分析各式青枯病菌株之脂多醣生合成

將青枯病菌脂多醣萃取並注入 4-12% SDS-polyacrylamide gel，再利用銀染分析脂多醣，R-LPS 為粗型脂多醣，而 S-LPS 為平滑型脂多醣。本實驗已重複三次，並得到一致結果。



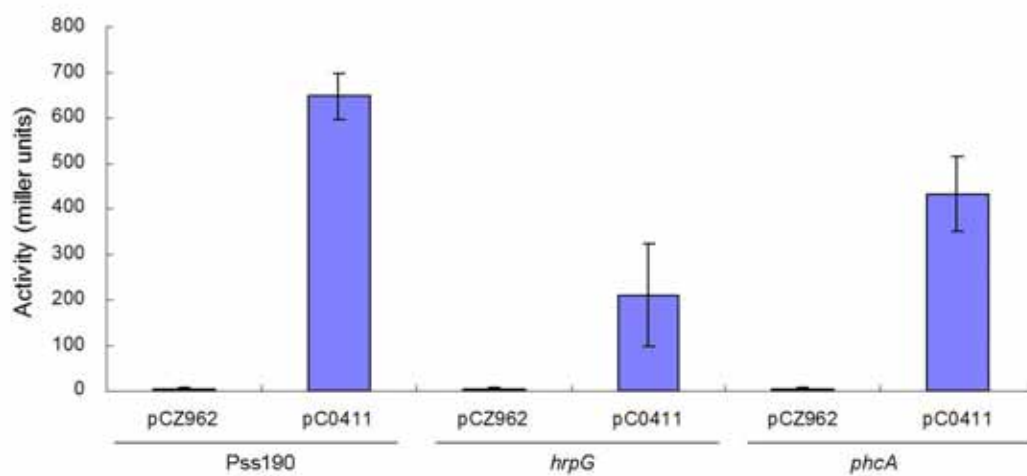
圖十四、比較各細菌中 DUF1239 相關基因群之操縱子結構(operon organization)及基因成員。

比較各細菌中 DUF1239 蛋白附近的基因是否相似，相同圖案之箭頭代表不同細菌中的同源基因，將各細菌同源基因與青枯病菌基因做序列比對，並以 identity/similarity % 呈現。圖中小箭頭代表啟動子所在位置。



圖十五、青枯病菌野生株與 *RSc0411* 突變株中第三型分泌系統相關基因表現量的測定

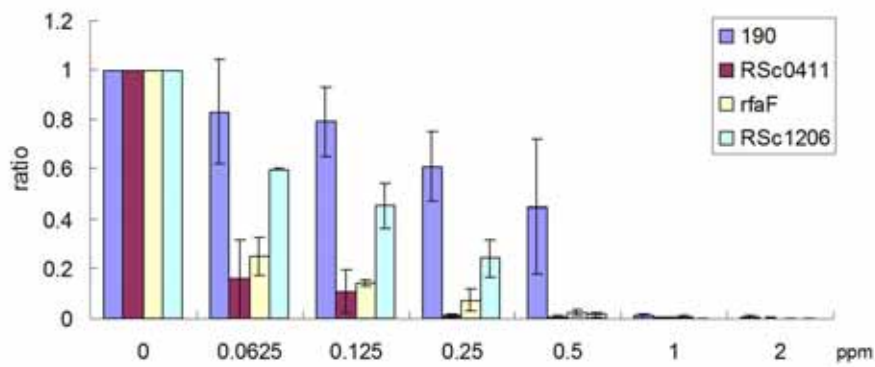
利用定量 RT-PCR 第三型分泌系統相關基因 *hrpB*、*hrpY*、*popA* 和 *popC* 的 RNA 表現量，所有 RNA 的表現量皆用青枯病菌的 16S rRNA 做回歸。本實驗已重複兩次，每次實驗三個值，並得到一致結果。



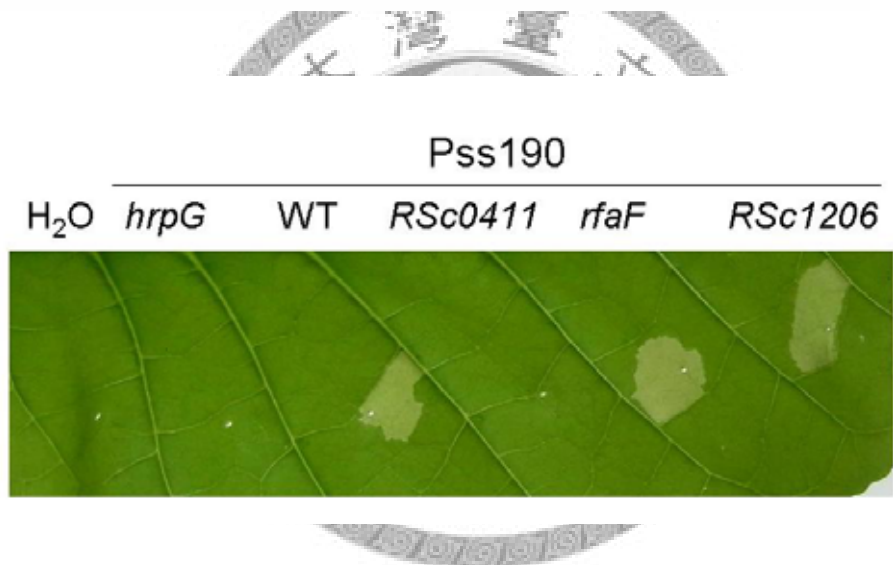
圖十六、*RSc0411* 啟動子在不同菌株中的表現分析

本研究利用 β -galactosidase 分析法檢測 *RSc0411* 啟動子(pC0411)在野生型菌株與其 *hrpG* 和 *phcA* 突變株中的活性表現，本實驗在營養貧瘠液體培養基 MP 下進行，已重複三次以上，並利用三次的實驗結果計算其標準偏差。

(A)



(B)

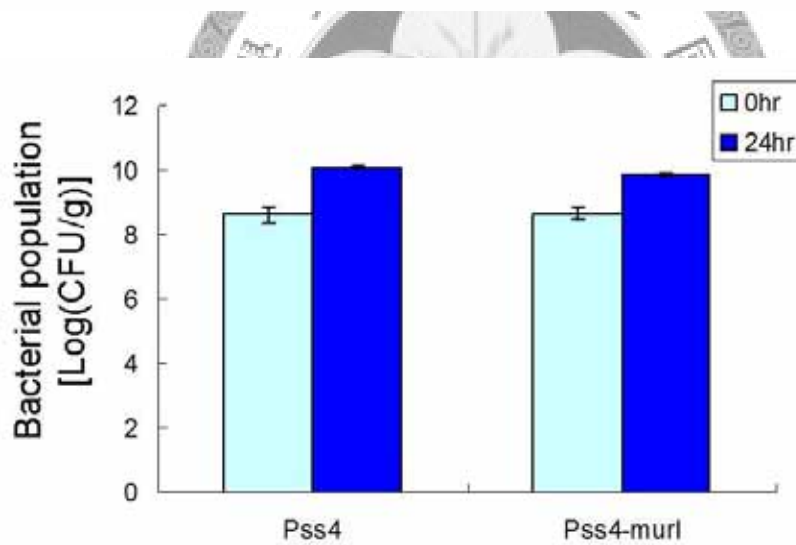
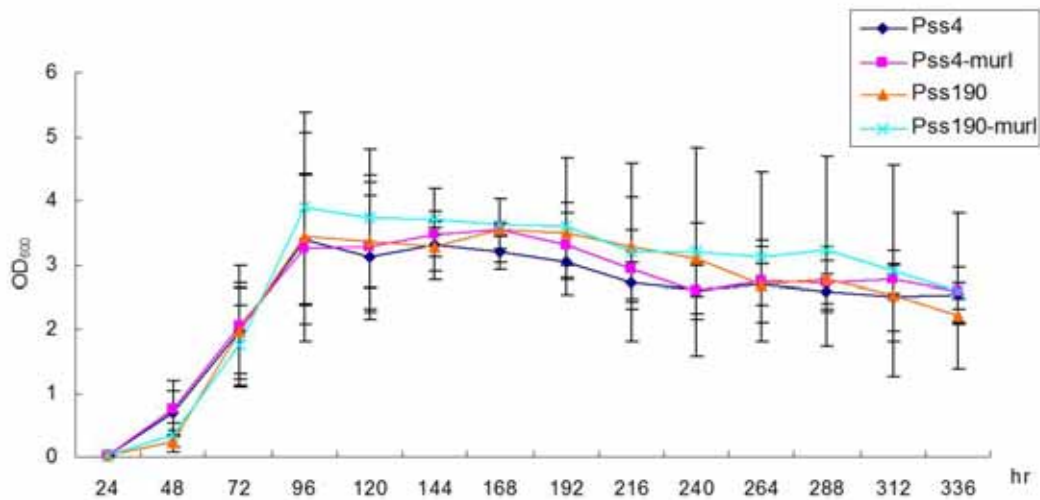


圖十七、青枯病菌野生株、*RSc0411* 突變株及其他膜完整性缺失突變株特性分析

(A) 青枯病菌各個菌株以 tyropricin 逆境之抗性來檢測膜之完整性，各菌株並以無添加任何 tyropricin 的菌量數值為 1，以比值方式呈現不同濃度逆境青枯病菌的菌量，此實驗已經重複三次，由三次的實驗的結果計算其標準偏差。(B) 青枯病菌各個菌株注入菸草 Wisconsin 38 (W38)，24 小時後過敏性反應的產生。此實驗已經重複三次，並得到相同結果。

II、*murI* 基因之功能分析

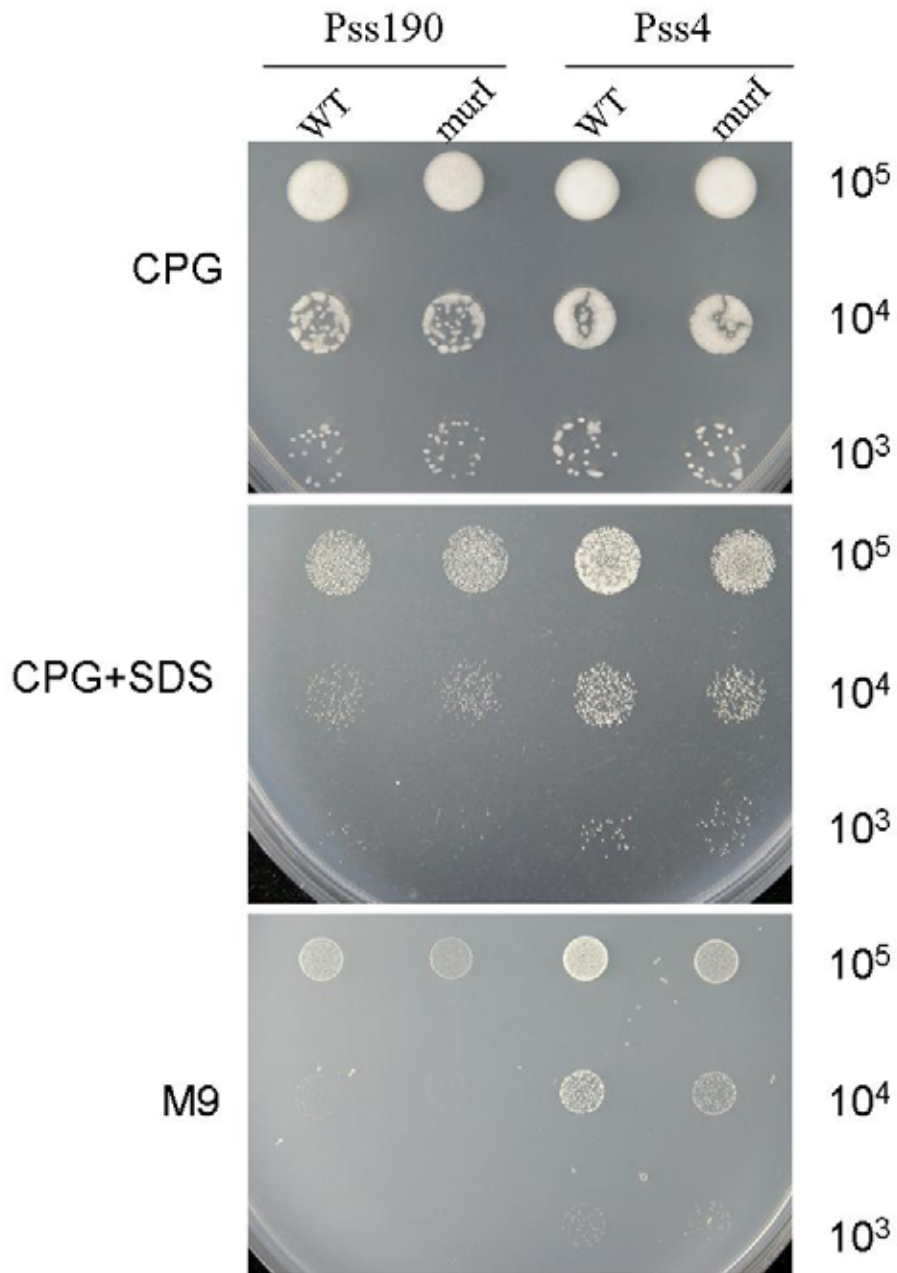
(A)



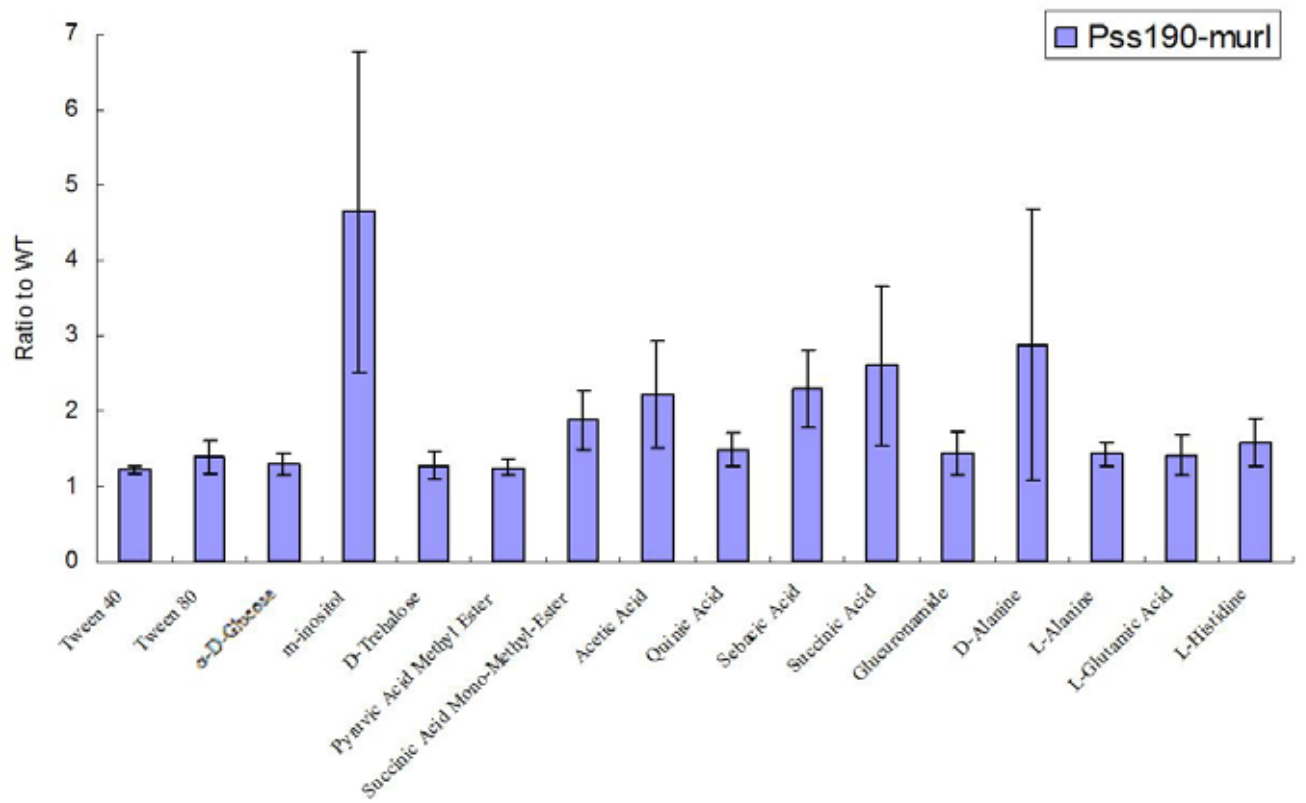
(B)

圖十八、青枯病菌野生型菌株和 *murI* 突變株生長速度比較

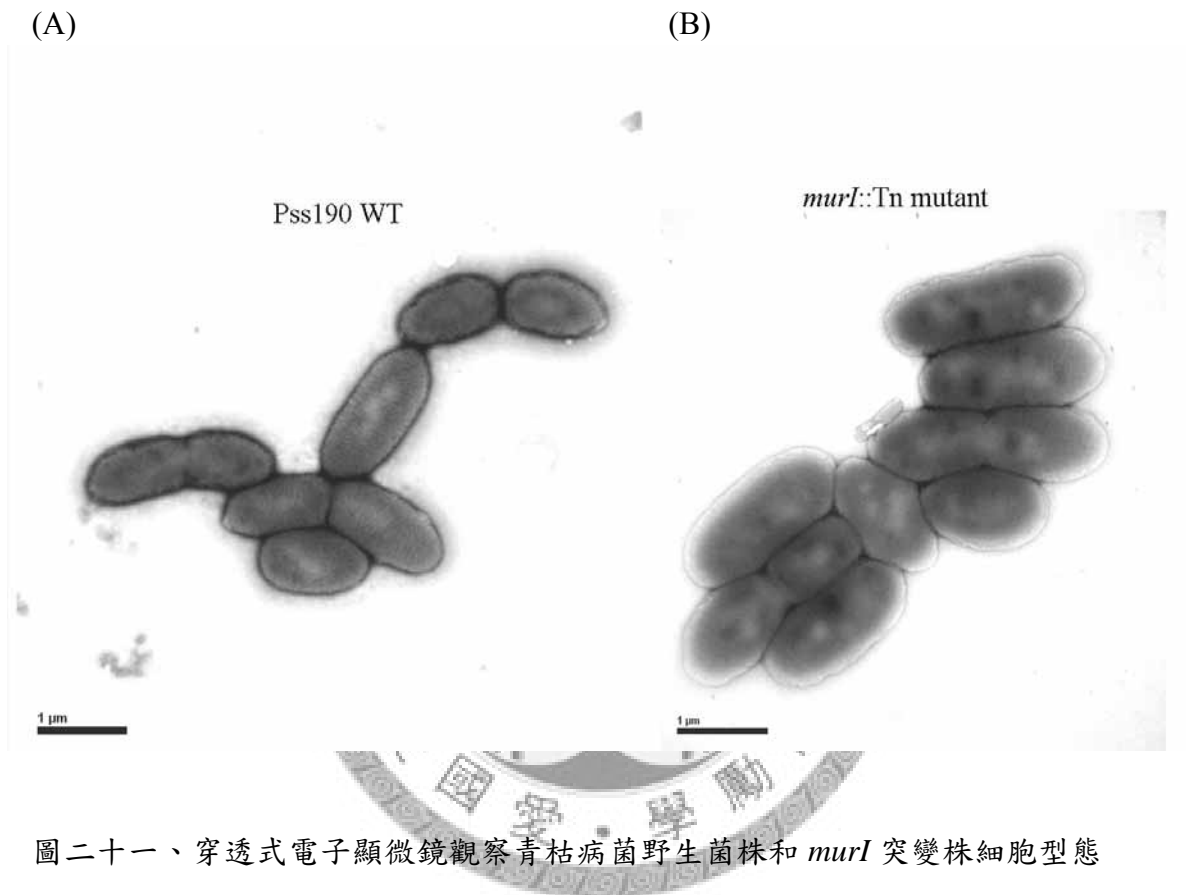
(A)利用營養貧瘠液體培養基(M9)測青枯病菌野生型菌株和 *murI* 突變株的生長曲線。(B)野生型菌株和 *murI* 突變株在注入菸草 *N. benthamiana* 葉肉組織的0、24小時取菸草組織測植物體內青枯病菌含量。本實驗已重複三次，由三次的實驗結果計算其標準偏差。



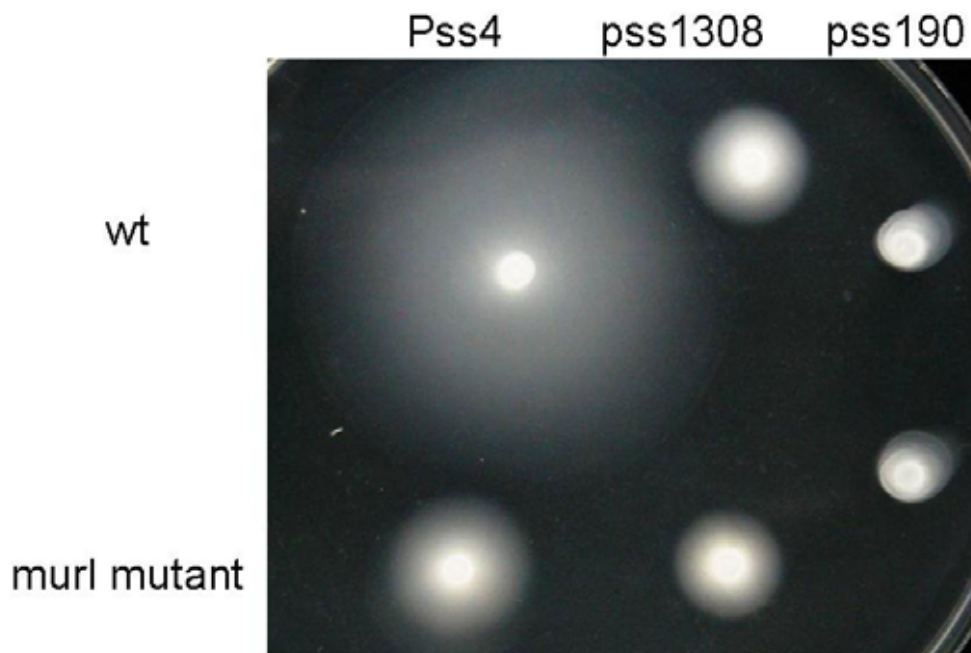
圖十九、青枯病菌野生菌株和 *murI* 突變株在不同固體培養基下的生長情形。取青枯病菌濃度約 10^3 、 10^4 和 10^5 CFU/mL 的菌液 $10 \mu\text{L}$ 滴在營養貧瘠(M9)、營養豐富(CPG)、含有細胞結構相關的逆境的營養豐富固體培養基 CPG+SDS 上，靜置於在 28 生長箱二至三天。本實驗已經重複三次以上，各菌株在三次實驗中趨勢皆相同。



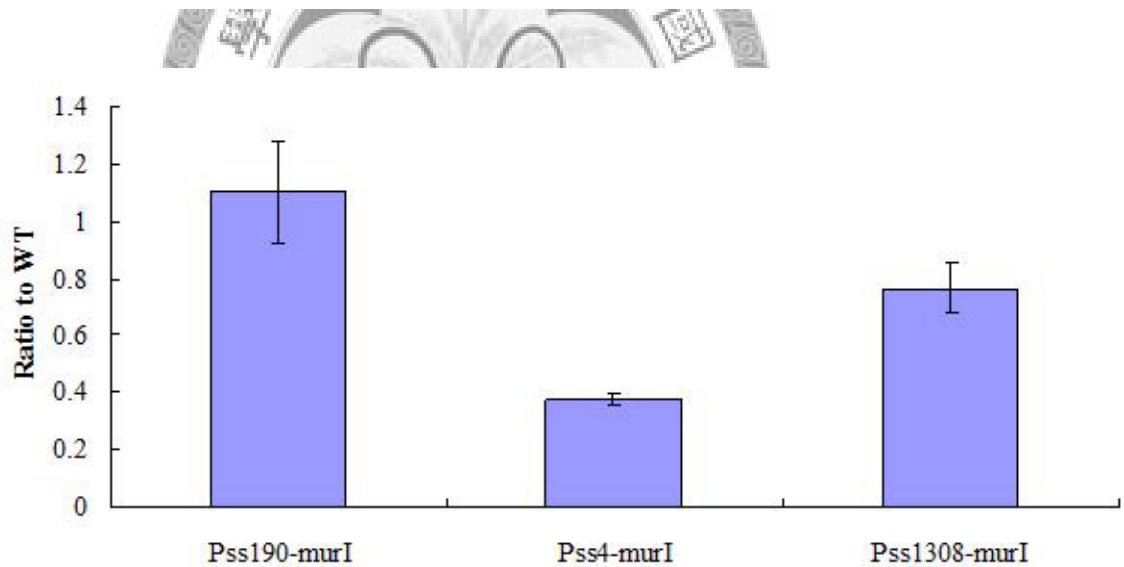
圖二十、青枯病菌野生型菌株和其 *murl* 突變株碳源、氮源(BiologTM)利用分析
 利用商業套組(BiologTM)分析青枯病菌野生型菌株和其 *murl* 突變株碳源、氮源的利
 用，經三次實驗後將有差異的碳源、氮源列出，並以比值呈現。



(A)

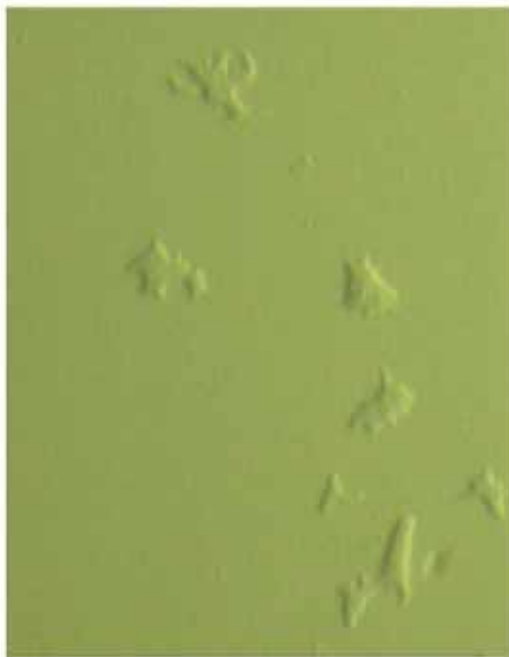


(B)

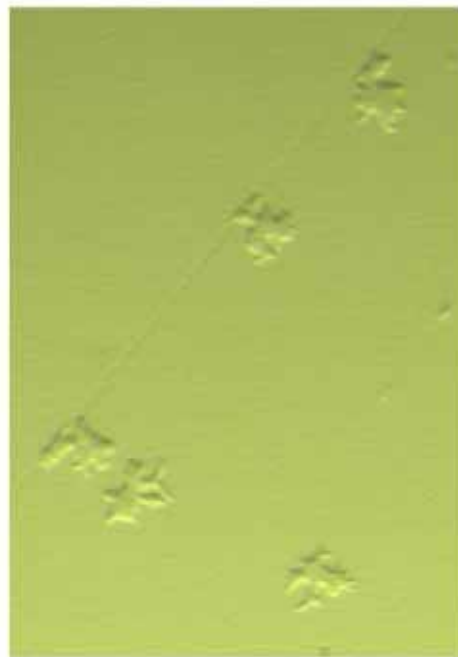


圖二十二、青枯病菌野生型菌株和 *murI* 突變株游動能力 (swimming motility) 的測試
(A) 野生型菌株和 *murI* 突變株在 0.3% agar 上測試其游動力。(B) 將 Pss190、Pss4、Pss1308 背景下 *murI* 突變株游動直徑和其野生型菌株比較，以野生型菌株為 1 的比值呈現。本實驗以重複三次以上，利用三次的實驗結果計算其標準偏差。

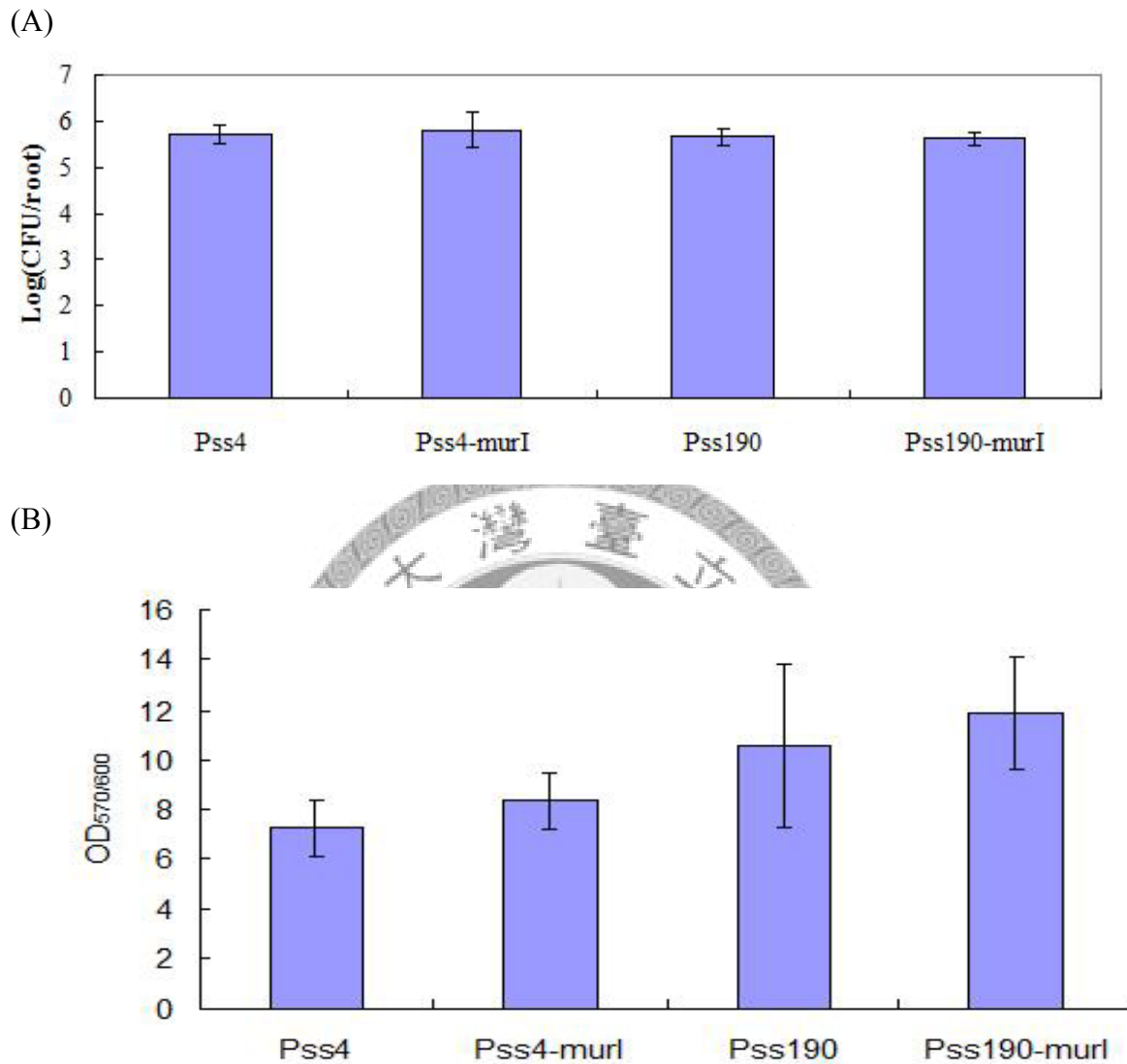
Pss4



Pss4-*murI*



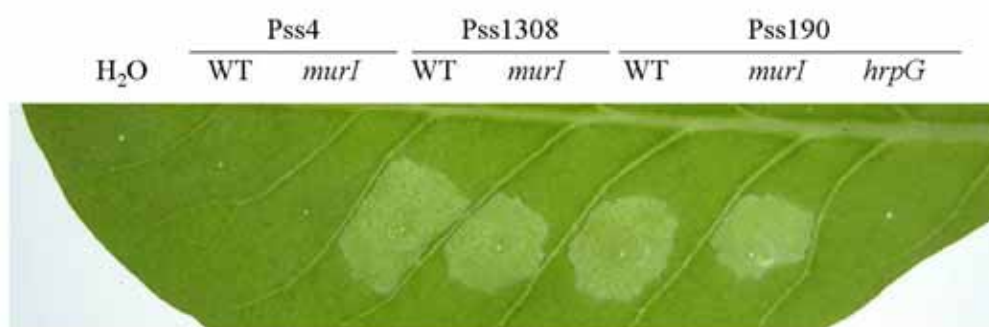
圖二十三、青枯病菌野生型菌株和 *murI* 突變株游動力(twitching motility)測試



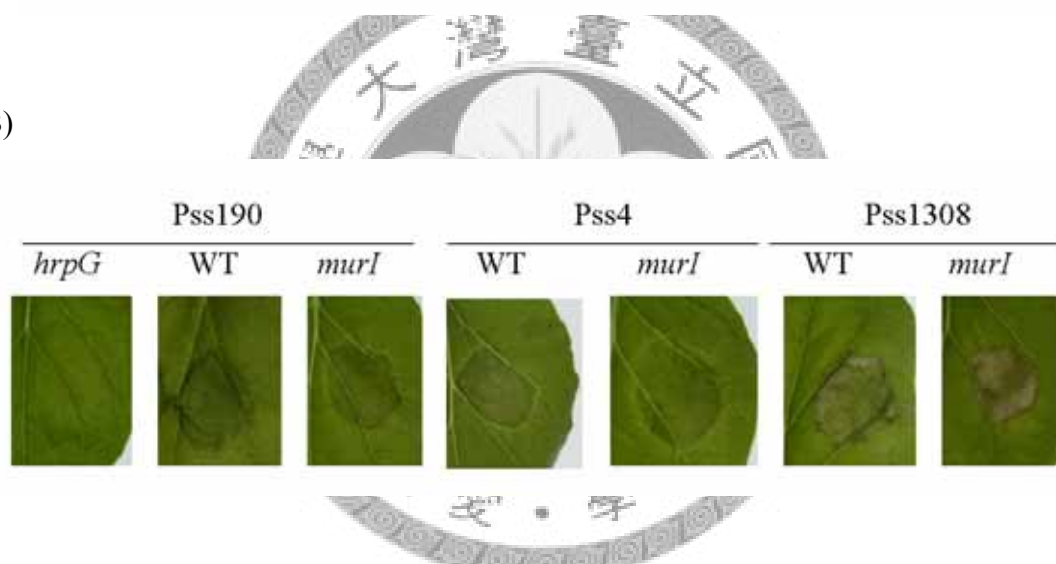
圖二十四、青枯病菌野生型菌株和 *murI* 突變株番茄根部附著力與生物膜形成能力分析

(A) 番茄幼根感染青枯病菌各個菌株 4 小時後，測量幼根的表面附著的菌量，並以指數(Log_{10})表示。本實驗已經重複三次，由三次的實驗結果計算其標準偏差。(B) 青枯病菌野生型菌株和 *murI* 突變株生物膜形成能力之分析。每次實驗每個菌株皆重複九次，此實驗已經重複四次，由四次的實驗結果計算其標準偏差。

(A)



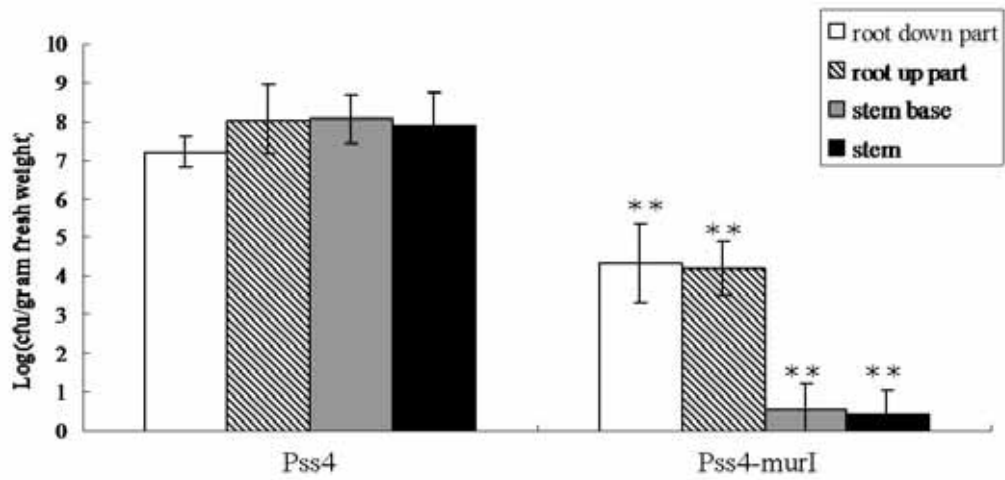
(B)



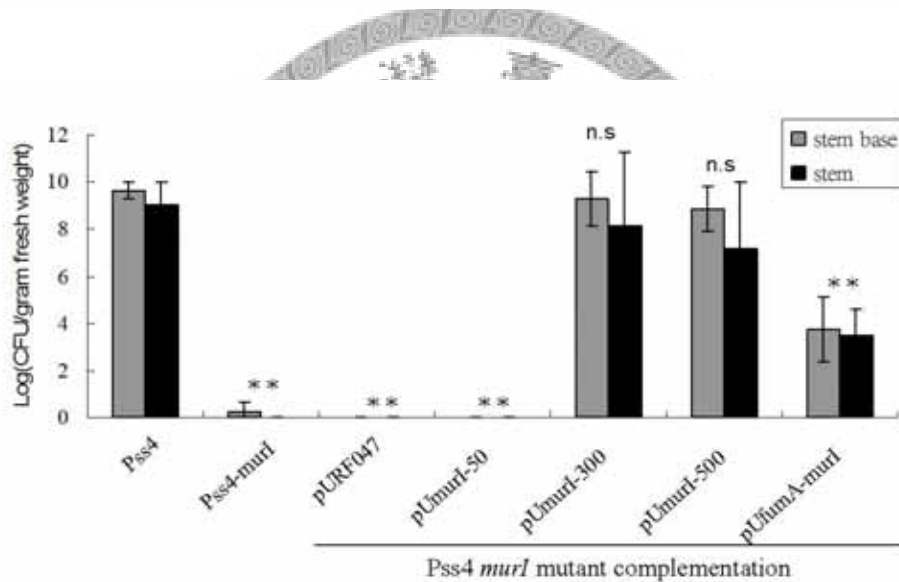
圖二十五、青枯病菌野生菌株和 *murI* 突變株於菸草的反應

(A)將青枯病菌各個菌株注入菸草 Wisconsin 38 (W38)，24 小時後觀察過敏性反應。(B)將青枯病菌各個菌株注入菸草 *N. benthamiana* 72 小時後，葉片產生壞死 (necrosis) 或者黃化 (chlorosis) 病徵。

(A)



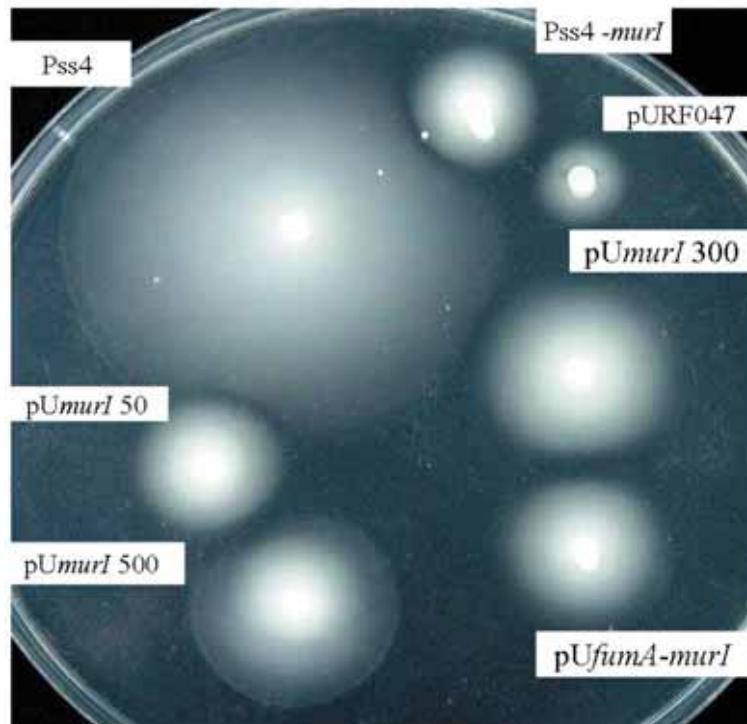
(B)



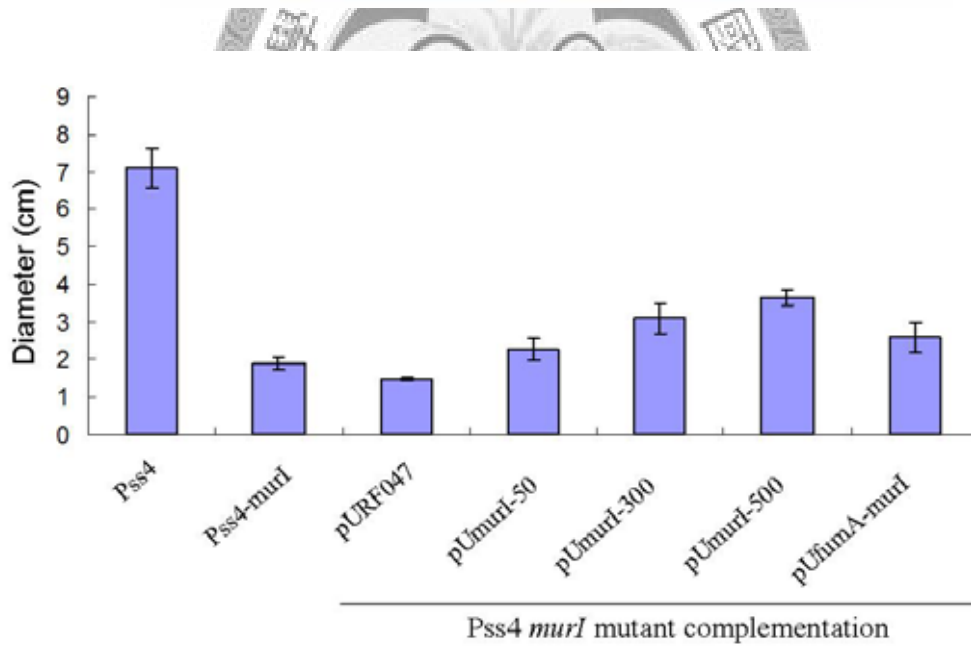
圖二十六、青枯病菌野生菌株和 *murI* 突變株番茄病原性測試

(A) 三個星期大的番茄進行根部澆灌青枯病菌野生菌株和 *murI* 突變株，七日後測量植株根上部、根下部、莖基部、莖部所含的青枯病菌菌量。(B) 三個星期大的番茄進行根部澆灌野生菌株、*murI* 突變株及其互補株，七日後測量植株莖基部、莖部所含的青枯病菌菌量，菌量以 $\text{Log}_{10}(\text{CFU}/\text{gram plant tissues})$ 呈現。本實驗已重複三次，利用三次的實驗結果(共 18 棵植株)計算其標準偏差，並以統計 Student *t*-test method 分析，以野生型菌株為比較對象，** 表示有顯著差異($P < 0.001$)，n.s.表示無顯著差異。

(A)



(B)



圖二十七、青枯病菌野生菌株、*murI* 突變株和其互補株游動力(swimming)測試

(A) 各菌株在 0.3% agar 上測試其游動力。(B)測量圖(A)青枯病菌游動直徑。本實驗以重複三次以上，利用三次的實驗結果計算其標準偏差。

附錄一、青枯病菌 *RSc0411* 研究所使用之引子

Strain	Target gene	Primer sequence (5'-3') ^a
Complementation study		
<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>RSc0411</i>	F' <u>ATGAATTC</u> GCCTCGCCGACCTGATCCTCAA R' GCAAGCTTTGATAGACCTGCTTCAGGTC
<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	<i>RALTA_A0334</i>	F' <u>GCGAATTC</u> GAAAGCCAACCGCATCAACCA R' <u>ATAAGCTTT</u> CATGTTGGCAGGGTTGCTT
<i>Ralstonia metallidurans</i>	<i>Rmet_0306</i>	F' <u>GCGGATCCT</u> GATGGAAATCACCCGCAA R' <u>ATCTGCAGT</u> GTCGTCAGGGAAGCAGTCA
<i>Ralstonia eutropha H16</i>	<i>H16_A0390</i>	F' <u>GCGAATTC</u> CACGTGGTCAACGAGAACCA R' <u>ATAAGCTTT</u> CATGTTGGCAGGGTTGCTT
<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i>	<i>XCV3115</i>	F' <u>CGGGATCC</u> CAACGCGCATCCATGGATTG R' <u>CGGAATTCT</u> CGTCGAGCATGTTGCAATC
<i>Erwinia carotovora</i> subsp. <i>carotovora</i>	the <i>E. carotovora</i> subsp.	F' <u>CGGGATCC</u> CAGATTATGTCACCCGCATT
	<i>carotovora</i> homologue of	R' <u>CGGAATTC</u> GGCAAAGGTGGAAATGCTGA
	<i>E. carotovora</i> subsp.	

atroseptica ECA0292

Escherichia coli

lptC

F' CGGAATTCTCTGCTGGAAAACTGGCGA

R' ACTAGTAAGCTTTTAAGGCTGAGTTTGTGTTGTTTG

Promoter study

Ralstonia solanacearum

RSc0409

F' CGAAGCTTGTCTATCACCTGTCCGGCAA

(nt. 437941 -438400)^b

R' CGTCTAGAACATAGGCGAAGCGGAAAAG

RSc0410

F' CGAAGCTTGTCCACCAAATACCGCTTCAC

(nt. 438541 -439038)

R' CGTCTAGAGGGTGTTCGGTCATGGAAATC

RSc0411

F' CGAAGCTTATTACGCCGGCCATCATCAC

(nt. 439234 -439633)

R' CGTCTAGATTGAGAGCGTTCGCTGGCCAT

RSc0412

F' CGAAGCTTAAATCACCCGCAAGGGCAT

(nt. 439807 -440180)

R' CGTCTAGATGTTGCTGTGGACGGGGGAAT

RSc0413

F' CGAAGCTTCGCGAAAAATCAGGCGAAAG

(nt. 440851 -441166)

R' CGTCTAGAGAAATTCGCTATCATGGCGG

qRT-PCR study

Ralstonia solanacearum

popA

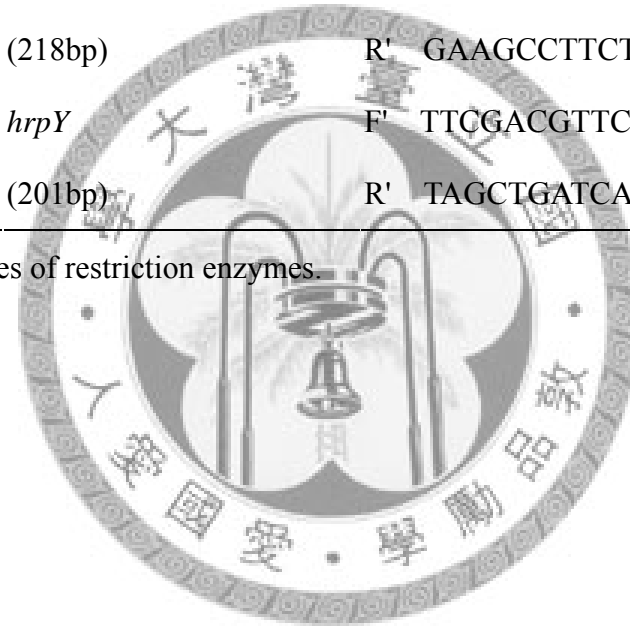
F' ATCCTCAACATCATCGCAGC

(248bp) ^c	R' AGCAGCTTCACCAGGTCTTC
<i>popC</i>	F' AGGACAATCCAAAGCTGGAG
(247bp)	R' GTGAACAAGTTCCCGATGCT
<i>hrpB</i>	F' TGGGAAACATCTACTTCGCC
(218bp)	R' GAAGCCTTCTTCCGCTTCTT
<i>hrpY</i>	F' TTCGACGTTCCAGTCTTTCG
(201bp)	R' TAGCTGATCAGGTCCTTGGC

^a Sequences underlined indicate recognition sites of restriction enzymes.

^b The putative promoter sequences analyzed.

^c Amplicon size for RT-qPCR study

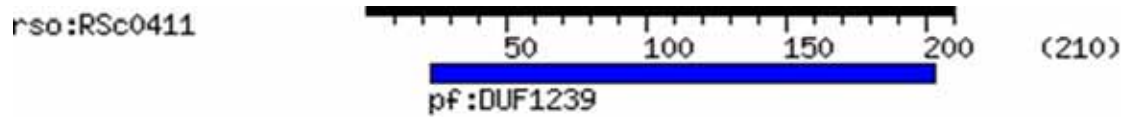


附錄二、青枯病菌 *murI* 研究所使用之引子

Strain	Target gene	Primer sequence (5'-3') ^a
Complementation study		
<i>Ralstonia solanacearum</i>	<i>murI</i> and <i>upstream</i> 50 bp	F' AT <u>GGATCCA</u> AGATCGGCAAGATCCCGGT
		R' CGAAGCTTCGGATTGCTTATTGGTGCGA
	<i>murI</i> and <i>upstream</i> 300 bp	F' AT <u>GGATCCT</u> GATCGCCATGGTCGGCACG
		R' CGAAGCTTCGGATTGCTTATTGGTGCGA
	<i>murI</i> and <i>upstream</i> 500 bp	F' AT <u>GGATCCCT</u> CAACGGCAAGATGCTCAC
		R' CGAAGCTTCGGATTGCTTATTGGTGCGA
	<i>murI</i> and <i>fumA</i>	F' AT <u>GGATCCGC</u> ATTGCGTGTATGATTCCG
		R' CGAAGCTTCGGATTGCTTATTGGTGCGA

^a Sequences underlined indicate recognition sites of restriction enzymes.

(A)

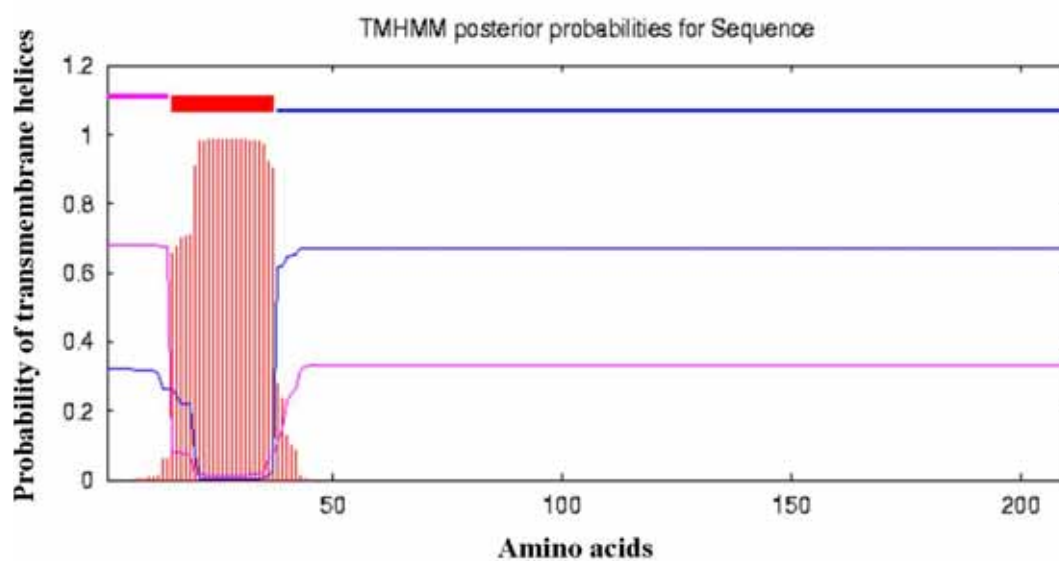


(B)



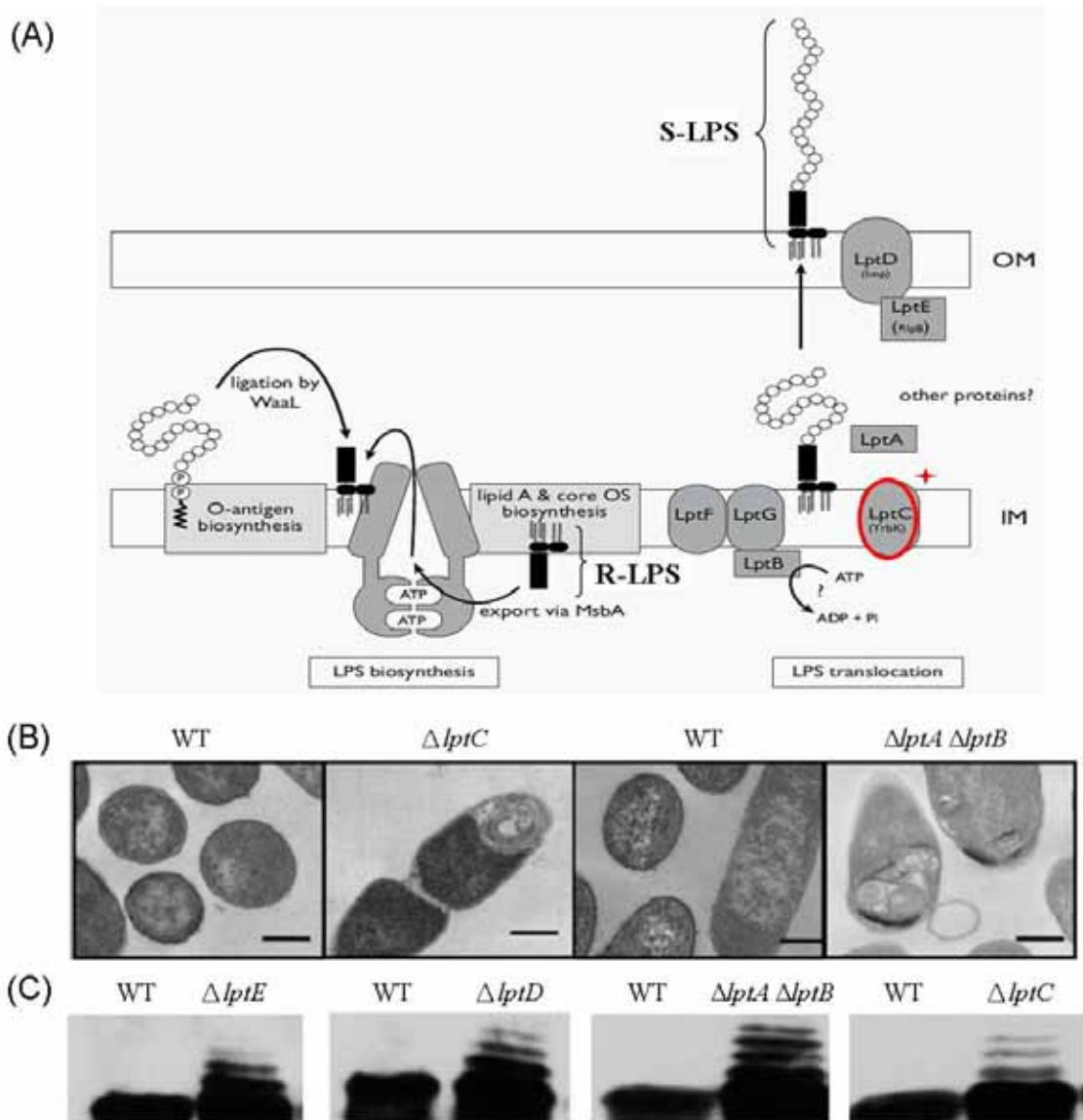
附錄三、利用生物資訊軟體分析 DUF1239 蛋白家族。

(A) RSc0411 蛋白利用 NCBI 比對，發現其蛋白是屬於未知功能的 DUF1239 蛋白家族。(B) DUF1239 蛋白在不同物種之分類範圍 (taxonomic coverage)，數字表物種中已知之 DUF1239 蛋白數量。



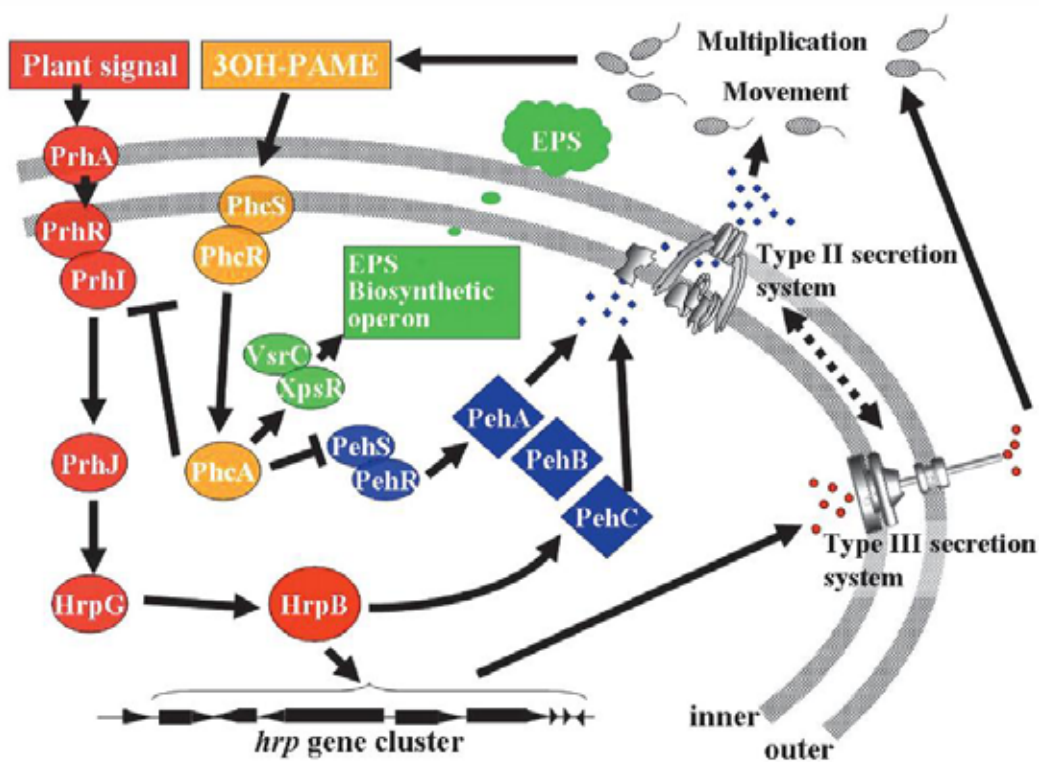
附錄四、RSc0411 膜蛋白的預測

利用 TMHMM Server v. 2.0 軟體對 RSc0411 蛋白進行預測，發現 RSc0411 蛋白有 transmembrane helices 區域 (紅色區域)。而粉紅色代表在細胞質膜以外，藍色代表在細胞質膜以內。



附錄五、大腸桿菌 LPS 的合成與運送及 LPS 運送突變株之表現型態分析

(A)大腸桿菌 LPS 的合成(從 R-LPS 到 S-LPS)及從內膜運送 LPS 到外膜中所需的蛋白，其中標星號的為青枯病菌 RSc0411 在大腸桿菌中的同源基因 LptC (Tran et al., 2008)。(B)穿透式電子顯微鏡觀察大腸桿菌野生型菌株與 LPS 運送突變株超薄切片 (Sperandeo et al., 2008)。(C)銀染分析大腸桿菌野生型菌株與 LPS 運送突變株脂多糖(Sperandeo et al., 2008)。



附錄六、青枯病菌複雜的致病調控系統 (Hikichi et al., 2007)

青枯病菌接受到寄主植物的訊號後，可藉由一連串的系统傳遞到轉錄調控因子 HrpG，HrpG 可藉由調控 HrpB 進而影響整個第三型分泌系統下游的 *hrp* 基因群。

Strain	Puncture(%) ^a	Drench					
		Tomato			Arabidopsis		
		Score ^b	B(+/T) ^c	M(+/T) ^c	Score ^b	B(+/T) ^c	M(+/T) ^c
Pss190	100	5	-	-	3.6	-	-
<i>murl</i>	89	0	12/12	4/12	0.1	9/11	1/33
<i>rfaF</i>	56	1.2	0/10	0/10	0.3	7/9	1/24
RSc0411	0	0	1/12	0/12	0	9/12	10/35

^a Percentage of wilted plants recorded 21 days postinoculation (DPI) when the mutants were inoculated by puncturing into leaf axis.

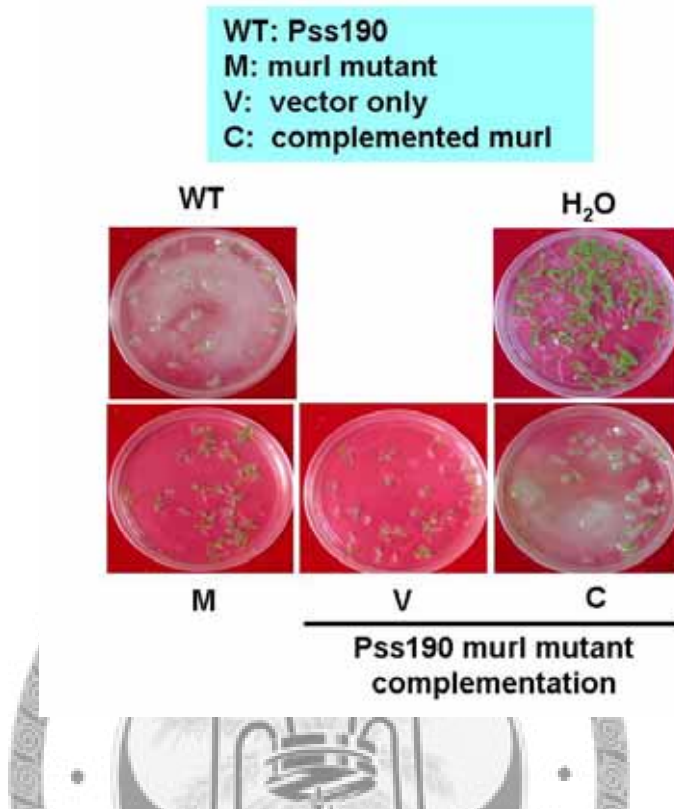
^b Mean severity score based on symptoms observed 21 DPI as described in Materials and Methods.

^c Presence of *R. solanacearum* on stem base (B) or midstem (M) of tomato, or collar (C) or midpoint (5 cm above stem) of flower stalk (Mf) of *Arabidopsis* presented as number of positive isolation (+) versus number of total samples (T); - indicates that plants of the resistant reaction were not assayed.

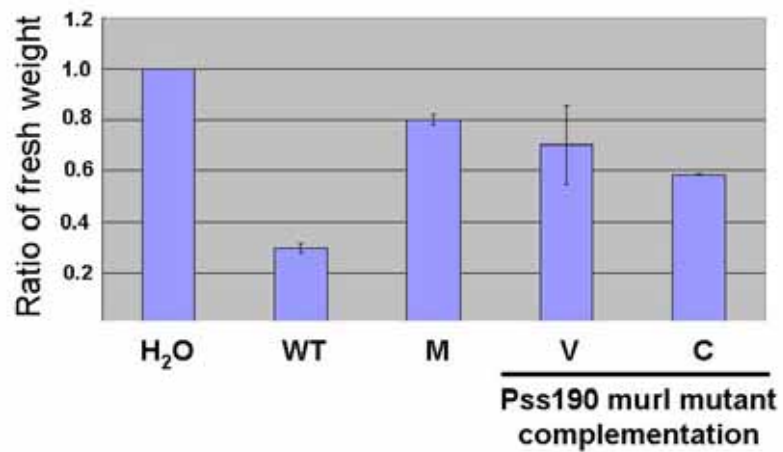
附錄七、實驗室前人測試野生型菌株 Pss190 及其突變株在番茄及阿拉伯芥病原性(Lin et al., 2008)。

野生型菌株 Pss190 及其突變株分別以澆灌及莖穿刺法感染三個星期大的番茄植株，並且澆灌感染四個星期大的阿拉伯芥植株。萎凋指數(score)共分 0 到 5 級，所有澆灌感染的植株皆計算其平均萎凋指數。

(A)

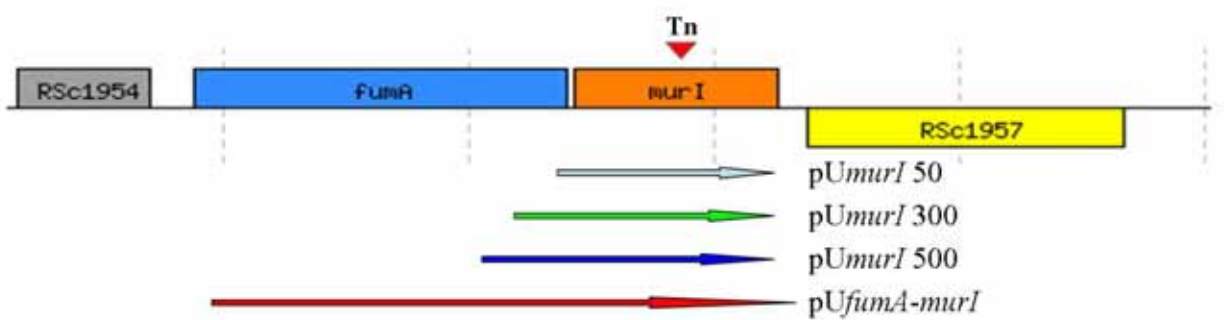


(B)



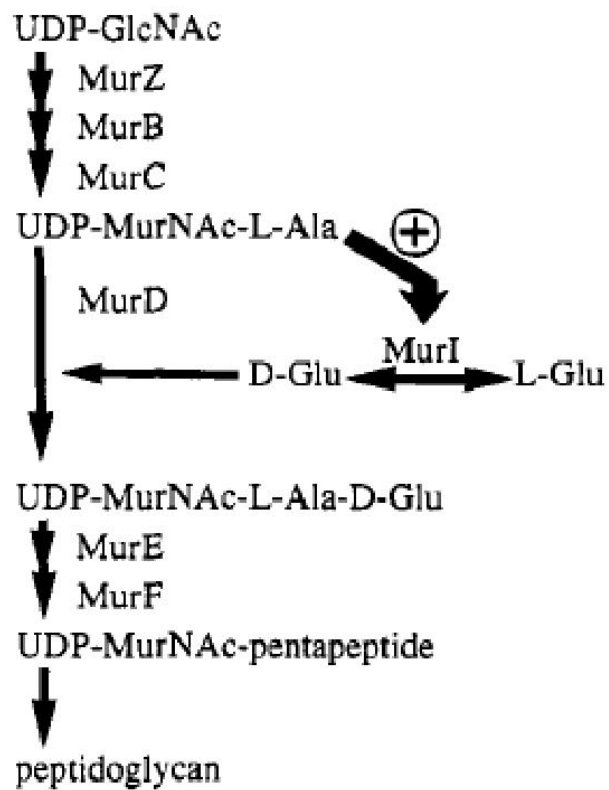
附錄八、實驗室前人在 Pss190 背景下互補 *murI* 突變株的病原性分析

(A)利用兩個星期大的阿拉伯芥小苗測試青枯病菌各菌株的致病力 (B) 澆灌各菌株的植株與對照組澆灌無菌水的植株鮮重比值

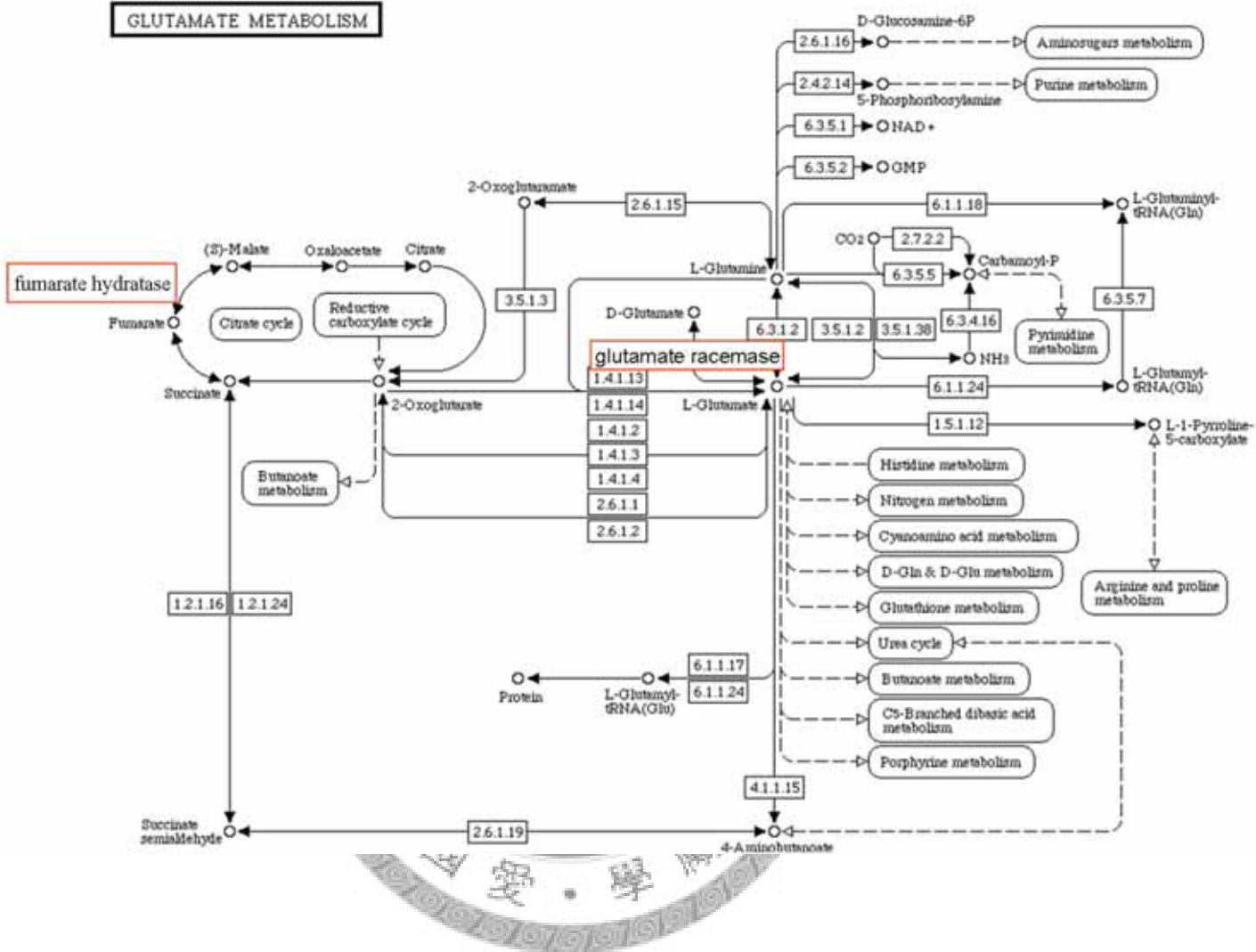


附錄九、本研究 Pss4 背景下 *murI* 突變株進行不同長度的互補實驗

本研究總共互補四個不同長度的 *murI* 互補株，分別是 *murI* 基因前推上游 50 bp、300 bp、500 bp 及前推上游基因 *fumA* 的互補株。



附錄十、肽聚糖合成路徑圖(Doublet et al., 1994)



附錄十一、生物體內 glutamate 的代謝路徑

murI 基因的蛋白產物為 glutamate racemase，*fumA* 基因的蛋白產物為 fumarate hydratase。

附錄十二、常用培養基配方

TTC medium (Denny and Hayward, 2001)

TTC medium	
Component	per Liter
Peptone	10 g
Casein hydrolysate	1 g
Glucose	5 g
5% TTC	1 mL
Agar	15 g

CPG medium (Denny and Hayward, 2001)

CPG medium	
Component	per Liter
Peptone	10 g
Casein hydrolysate	1 g
Glucose	5 g
Agar	15 g

523 medium (Kado and Heskett, 1970)

523 medium	
Component	per Liter
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 g
K ₂ HPO ₄	2 g
Yeast extract	4 g
Casein hydrolysate	8 g
Sucrose	10 g
Additional 15g agar for agar medium	

M9 medium (Sambrook et al., 1989)

5X M9 salt	
Component	per Liter
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	42.63 g
KH ₂ PO ₄	15 g
NaCl	2.5 g
NH ₄ Cl	5 g

→Autoclave

M9 medium	
Component	per 100 mL
5X M9 salt	20 mL
1M MgSO ₄	200 µL
1M CaCl ₂	10 µL
40% Glucose	1 mL
H ₂ O	78.79 mL
Additional 15g agar for agar medium	

SM1 medium (Tsai et al., 1985)

SM1 medium	
Component	per Liter
TTC medium	1 L
5% Polymyxin B	2 mL
1% Tyrothricin	2 mL
0.5% Chloramphenicol	1 mL
1% Cycloheximide	0.5 mL
1% Crystal violet	0.5 mL
Agar	15 g

MP medium (Greenstein and Besmond, 1999)

2X MP salt	
Component	per Liter
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	6.8 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0025 g
→Adjust pH to 7.0 with KOH	
→Autoclave	

MP medium	
Component	per 100 mL
2X MP salt	50 mL
40% Glucose	0.5 mL
H ₂ O	45.5 mL

BG medium (Boucher et al., 1985)

BG medium	
-----------	--

Component	per Liter
Peptone	10 g
Yeast extract	1 g
Casein hydrolysate	1 g
Glucose	5 g

Motility agar medium (Liu et al., 2005)

Swimming motility agar medium	
Component	per 100mL
Tryptone	1 g
Agar	0.3 g

Twimming motility agar medium	
Component	per 100 mL
Peptone	1 g
Casein hydrolysate	0.1 g
Glucose	0.5 g
Agar	1.5g

Exoenzyme assay medium (Liu et al., 2005)

Basal medium (BM) for exoenzyme assay (Clough et al., 1994)	
Component	per Liter
K ₂ HPO ₄	1.75 g
KH ₂ PO ₄	0.75 g
Sodium citrate	1.5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.25 g
50% glycerol	10 mL

Egl medium	
Component	per 100 mL
BM	100 mL
1M MgSO ₄	0.1 mL
1M CaCl ₂	0.1 mL
Carboxymethylcellulose	0.5 g
Agar	1.6 g

Pme medium	
Component	per 100 mL
BM	100 mL
1M MgSO ₄	0.1 mL

1M CaCl ₂	0.1 mL
Pectin	0.48 g
Agar	1.6 g
Peh medium	
Component	per 100 mL
BM	100 mL
Sodium polygalacturonate	0.5 g
Agar	1.6 g

LB Medium (Sambrook et al., 1989)

LB medium	
Component	per Liter
Tryptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	10 g
→Adjust pH to 7.0	
Additional 15 g agar for agar medium	

SOC medium (Sambrook et al., 1989)

SOC Medium	
Component	per Liter
Tryptone	20 g
Yeast extract	5 g
NaCl	0.5 g
250 mM KCl	10 mL
→Add H ₂ O to 900 mL, adjust pH to 7.0, and add water to 990 mL	
→Autoclave	
1M MgCl ₂	10 mL
1M Glucose	20 mL

本論文使用之化學藥品配方

Compound	Stock	Solvent
Tyrosin	10 mg/mL	Ethanol
Polymyxin B	50 mg/mL	Water
Chloramphenicol	25 mg/mL	Ethanol

Alkaline lysis (Sambrook et al., 1989)

Soluton	
Components	per 100 mL
Glucose	0.9 g
0.5 M EDTA	2 mL
1 M Tris-HCl (pH 8.0)	2.5 mL

Solution	
Components	per 100 mL
10 N NaOH	2.0 mL
20% SDS	5.0 mL
Freshly prepared	

Solution	
Components	per 100 mL
KOAc	29 g
Glacial acetic acid	17.25 mL

Genomic DNA extraction

Lysis buffer	
Components	per 100 mL
50X TAE	2 mL
3 M NaOAc	0.67 mL
20% SDS	5 mL

β -galactosidase activity

Z buffer (Miller, 1972)	
Components	per Liter
Na ₂ HPO ₄	8.51 g
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	6.24 g
KCl	0.75 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.246 g
<i>B</i> -mercaptoethanol	2.7 mL

SDS-PAGE的製備

3X Dye	
Components	per 10 mL
1.5 M Tris (pH6.8)	0.417 mL
glycerol	2.5 mL
20% SDS	1 mL

Bromophenol blue		0.05 g
<i>B</i> -mercaptoethanol		0.5 mL
5X Running buffer		
Components		per Liter
Tris-HCl		15.1 g
glycine		94 g
SDS		5 g
SDS-PAGE gel		
Components	Separating gel (12%)	Stacking gel (4%)
H ₂ O	4.35 mL	3.9 mL
40% acrylamide	3 mL	623 μL
1.5 M Tris (pH8.8)	2.5 mL	—
1.5 M Tris (pH6.8)	—	420 μL
20% SDS	50 μL	25 μL
10% APS	100 μL	50 μL
TEMED	4 μL	5 μL

